

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos
Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas
residuales mediante secuenciación de última generación**

Proyecto de Investigación

Samantha Carolina Posso Astudillo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 30 de abril de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales mediante secuenciación de última generación

Samantha Carolina Posso Astudillo

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres Salvador, Ph.D.

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 30 de abril de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Samantha Carolina Posso Astudillo

Código: 00121465

Cédula de Identidad: 1003460118

Lugar y fecha: Quito, 30 de abril de 2019

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres quienes con su amor, confianza y apoyo incondicional me han acompañado a lo largo de mi vida y carrera universitaria; sus enseñanzas me permitieron crecer como persona y culminar con éxito esta etapa de mi formación académica. Gracias padres por acompañarme siempre y brindarme la fuerza necesaria para cumplir con todo lo que me propongo; todos mis triunfos se los debo a ustedes.

Este trabajo también está dedicado con mucho cariño a la memoria de Andrea Carolina, quien siempre fue mi fuente de inspiración y me dio la fortaleza necesaria para seguir adelante en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por los consejos y apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A mis directores, Andrés Torres y Valeria Ochoa-Herrera que, con su calidad humana y amistad brindada siempre me guiaron, motivaron y apoyaron durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A Ana Cárdenas por haberme orientado permanentemente y apoyado incondicionalmente durante estos años en el desarrollo de este proyecto.

A todos los docentes de la USFQ que se involucraron en el proyecto, por guiarme y formar parte de la meta alcanzada.

A Raúl Andrade, por el amor incondicional y por acompañarme durante todos los buenos y malos momentos que se han presentado a lo largo de este arduo camino.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto de investigación.

RESUMEN

La creciente cantidad de aguas residuales generadas diariamente y su descarga directa en cuerpos de agua naturales, representa un gran problema en países como Ecuador. El tratamiento de aguas residuales con microalgas representa una alternativa interesante debido principalmente a su capacidad de asimilar nitrógeno y fósforo para su desarrollo y crecimiento. Específicamente, si se utiliza consorcios microalga-bacteria, el crecimiento y las tasas de absorción de nutrientes incrementan significativamente debido a la relación simbiótica generada entre estos microorganismos. Sin embargo, la información acerca de la dinámica y comunidad de estos consorcios es muy escasa. Por lo tanto, en el presente estudio se analizó la biodiversidad y comunidad bacteriana de 5 consorcios nativos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales domésticas. Los consorcios nativos podrían tener un potencial biorremediador adicional debido a las características que los hacen más eficientes en el desarrollo y asimilación de nutrientes en ecosistemas contaminados. Evidentemente, el uso de la metagenómica y de metodologías como la secuenciación de última generación, permitieron un análisis más profundo de las microalgas y la comunidad microbiana de cada una de las muestras. Las técnicas dependientes de cultivo presentaron varias limitaciones importantes para estudios de este tipo. Debido a la alta plasticidad morfológica de las microalgas, la identificación a niveles taxonómicos bajos de los morfotipos encontrados resultó difícil. Asimismo, el tamaño de la población microalgal de cada uno de los consorcios podría estar sesgado hacia las microalgas unicelulares por la unidad de conteo utilizada en el presente trabajo (UFC). No obstante, mediante el análisis metagenómico se determinó una diversidad de microalgas normal-alta para los consorcios M1B ($H' = 2.878$, $D = 0.904$), M2 ($H' = 2.447$, $D = 0.838$), M5 ($H' = 2.706$, $D = 0.854$) y M22B ($H' = 2.851$, $D = 0.820$); mientras que el consorcio M14A presentó una diversidad baja ($H' = 1.340$, $D = 0.401$). Sin embargo, resulta difícil relacionar la eficiencia de remoción de nutrientes con la diversidad de los consorcios en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Asimismo, las microalgas predominantes en cada consorcio fueron distintas; sin embargo, el potencial de biorremediación de cada una de ellas ha sido ilustrado en varias investigaciones. De igual forma, el perfil de la comunidad bacteriana de estos consorcios a niveles taxonómicos altos resulta prometedor debido a su similitud con la comunidad bacteriana encontrada en estudios de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) a nivel mundial. En general, la información presentada en este proyecto representa una base importante, tanto para el análisis de futuros consorcios nativos potenciales, así como para el desarrollo de un sistema eficaz de tratamiento de aguas residuales implementando estos consorcios.

Palabras clave: microalgas, diversidad, agua residual, remoción de nutrientes, comunidad microbiana, consorcios nativos Amazónicos, MinION.

ABSTRACT

The growing amount of wastewater generated daily and its direct discharge into natural water bodies represents a major problem in countries like Ecuador. Wastewater treatment with microalgae represents an interesting alternative, mainly due to their capacity to assimilate nitrogen and phosphorus for its development and growth. Specifically, if microalga-bacteria consortia are used, growth and nutrient absorption rates increase significantly due to the symbiotic relationship generated between these microorganisms. However, information about the dynamics and community of these consortiums is very scarce. Therefore, in this study, the biodiversity and bacterial community of 5 Amazonian native consortiums with wastewater bioremediation capacity were analyzed. Native consortiums may have an additional bioremediation potential due to the characteristics that make them more efficient in the development and assimilation of nutrients in contaminated ecosystems. Noticeably, the use of metagenomics and methodologies such as next generation sequencing, allowed a deeper analysis of the microalgae and the microbial community of each of the samples. Culture-dependent techniques presented several important limitations for this type of studies. Due to the high morphological plasticity of microalgae, the identification at low taxonomic levels of the morphotypes found in the cultures was difficult. Likewise, the size of the microalgal population of each of the consortia could be biased towards unicellular microalgae by the counting unit used in the present work (CFU). Nevertheless, through the metagenomic analysis, a normal-high diversity of microalgae was determined for consortia M1B ($H' = 2878$, $D = 0904$), M2 ($H' = 2447$, $D = 0838$), M5 ($H' = 2706$, $D = 0854$) and M22B ($H' = 2,851$, $D = 0.820$); while the M14A consortium presented a low diversity ($H' = 1,340$, $D = 0.401$). However, it is difficult to relate the performance to the diversity of the consortiums in wastewater treatment systems. Likewise, the predominant microalgae in each consortium were different, however, the bioremediation potential has been illustrated in several investigations. Additionally, the profile of the bacterial community of these consortiums at high taxonomic levels is promising due to its similarity with the bacterial community found in studies of wastewater treatment plants (WWTPs) worldwide. In general, the information presented in this project represents an important basis, both for the analysis of future potential native consortiums, as well as for the development of an effective wastewater treatment system implementing these consortiums.

Keywords: microalgae, diversity, wastewater, nutrient removal, microbial community, Amazonian native consortia, MinION.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| DERECHOS DE AUTOR | 3 |
| DEDICATORIA | 4 |
| AGRADECIMIENTOS | 5 |
| RESUMEN | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| TABLA DE CONTENIDO | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 11 |
| ANEXOS | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1. AGUAS RESIDUALES: PROBLEMAS Y CONTEXTO EN EL ECUADOR | 13 |
| 1.2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES | 14 |
| 1.3. MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES..... | 16 |
| 1.4. CONSORCIOS DE MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES | 17 |
| 1.5. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y DINÁMICA DE COMUNIDADES DE MICROALGAS..... | 19 |
| 1.6. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN PARA ESTUDIOS DE DIVERSIDAD DE COMUNIDADES. | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 3. ÁREA DE ESTUDIO | 22 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 5. MATERIALES | 24 |
| 5.1. CONSORCIOS MICROALGA-BACTERIA..... | 24 |
| 5.2. MEDIO DE CULTIVO BG-11 MODIFICADO | 24 |
| 5.3. CRIOCONSERVACIÓN DE CONSORCIOS..... | 25 |
| 5.4. IDENTIFICACIÓN MICROALGAS CULTIVABLES | 25 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.5. | EXTRACCIÓN ADN TOTAL DE CONSORCIOS, CUANTIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA | 25 |
| 5.6. | SECUENCIACIÓN ADN TOTAL DE CONSORCIOS..... | 26 |
| 5.7. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 26 |
| 5.8. | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO..... | 26 |
| 6. | MÉTODOS | 27 |
| 6.1. | PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO BG-11..... | 27 |
| 6.2. | SELECCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE CONSORCIOS..... | 27 |
| 6.3. | IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS CULTIVABLES | 28 |
| 6.3.1. | <i>Siembra, cuantificación e identificación de microalgas cultivables</i> | <i>28</i> |
| 6.3.2. | <i>Análisis estadístico.....</i> | <i>28</i> |
| 6.4. | ANÁLISIS METAGENÓMICO | 28 |
| 6.4.1. | <i>Extracción ADN total de los consorcios</i> | <i>28</i> |
| 7. | RESULTADOS..... | 30 |
| 7.1. | ANÁLISIS DEL CULTIVO TRADICIONAL | 30 |
| 7.1.1. | <i>Composición de microalgas.....</i> | <i>30</i> |
| 7.1.2. | <i>Diversidad de microalgas cultivables.....</i> | <i>31</i> |
| 7.2. | ANÁLISIS METAGENÓMICO | 32 |
| 7.2.1. | <i>Extracción y secuenciación del ADN total.....</i> | <i>32</i> |
| 7.2.2. | <i>Diversidad de microalgas</i> | <i>32</i> |
| 7.2.3. | <i>Comunidad bacteriana.....</i> | <i>34</i> |
| 8. | DISCUSIÓN..... | 35 |
| 8.1. | COMPARACIÓN TÉCNICAS TRADICIONALES DEPENDIENTES DE CULTIVO CON TÉCNICAS MOLECULARES | 35 |
| 8.2. | MICROALGAS, COMUNIDAD BACTERIANA Y POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN | 39 |
| 9. | CONCLUSIONES..... | 46 |
| 10. | RECOMENDACIONES..... | 47 |
| 11. | BIBLIOGRAFÍA | 48 |
| | TABLAS | 59 |
| | FIGURAS | 61 |
| | ANEXOS..... | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Resultados del conteo de morfotipos (UFC) de microalgas encontrados mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo. | 59 |
| Tabla 2 Índices de diversidad de familias de microalgas determinados a partir de los resultados de técnicas tradicionales dependientes de cultivo. | 59 |
| Tabla 3 Índices de diversidad de familias de microalgas determinados a partir de análisis metagenómicos. | 60 |
| Tabla 4 Porcentaje de microorganismos importantes en cada consorcio..... | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Micrografías de los morfotipos identificados durante el cultivo de microalgas. (A, B, N y O) Unclassified Chlorophyta [M1B, M2, M14A, M5, M22B]; (C) Leptolyngbyaceae [M5]; (D) Pseudanabaena sp. [M1B]; (E) Unclassified Cyanobacteria [M14A]; (F) Pseudanabanaceae [M14A]; (G) Leptolyngbya sp. [M2, M5]; (H) Synechocystis [M2]; (I) Unclassified Synechococcales [M2]; (J) Pseudanabaena sp. [M14A]; (K) Pseudanabaena sp. [M5]; (L) Leptolyngbya sp. [M5]; (M) Pseudanabaena sp. [M22B]..... | 61 |
| Figura 2 Composición de microalgas determinada a partir de las técnicas tradicionales dependientes de cultivo..... | 62 |
| Figura 3 Composición de microalgas más abundantes de los consorcios. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de microalgas con reads clasificadas >2% del total de microalgas. | 63 |
| Figura 4 Composición de los principales filos de bacterias de cada consorcio. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de bacterias clasificadas. “Otros” se refiere a taxones con abundancia promedio <1.5%. | 63 |
| Figura 5 Composición de clases de Proteobacteria en cada consorcio. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de Proteobacterias. “Otros” se refiere a clases con abundancia promedio menor a 10%. | 63 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1 Concentración y pureza del ADN extraído de los consorcios. | 64 |
| Anexo 2 Electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar la presencia del ADN extraído de los 5 consorcios. Ladder 100 pb (Invitrogen). | 64 |
| Anexo 3 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M1B analizado con el software MultiQC. | 65 |
| Anexo 4 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M2 analizado con el software MultiQC. | 65 |
| Anexo 5 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M14A analizado con el software MultiQC. | 66 |
| Anexo 6 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M5 analizado con el software MultiQC. | 66 |
| Anexo 7 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M22B analizado con el software MultiQC. | 67 |
| Anexo 8 Porcentajes de remoción de NH ₄ -N, PO ₄ -P y DQO obtenidos a partir de los ensayos de biorremediación de los consorcios microbianos en agua residual estéril. (Fuente: LIA-USFQ)..... | 67 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aguas residuales: problemas y contexto en el Ecuador

Las grandes cantidades de agua que son utilizadas diariamente para actividades domésticas, agrícolas, municipales e industriales conducen a la contaminación orgánica e inorgánica del medio ambiente debido a los grandes volúmenes de aguas residuales generadas. En el Ecuador, una gran proporción de estas aguas residuales (90%) es descargada directamente (es decir, sin tratamiento previo) en cuerpos naturales de agua dulce (Benítez, Champagne, Ramos, Torres, & Ochoa-Herrera, 2018), generando así una creciente contaminación de los recursos hídricos del país. Uno de los mayores problemas generados por la descarga continua de estos efluentes es el fenómeno de eutrofización; el cual implica el enriquecimiento de recursos hídricos en nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo que, en el caso de las aguas residuales domésticas e industriales, provienen de los desechos humanos, alimentos y el uso de ciertos jabones y detergentes (Gonçalves, Pires, & Simões, 2017; Tumlin & Mattsson, 2013). La eutrofización es responsable de la proliferación excesiva de algas, propagación de plantas acuáticas, agotamiento de oxígeno y la pérdida de especies clave que resulta en la degradación completa de los ecosistemas de agua dulce (Gonçalves et al., 2017). De hecho, diversos análisis de la calidad del agua de los ríos de Pichincha demuestran que éstos no son adecuados para su uso como suministros de agua, riego, uso recreativo ni tampoco para la conservación de especies acuáticas y silvestres (Armijos et al., 2011). Además, es un estudio acerca de la determinación de elementos mayores en ríos de la provincia de Pichincha, Ecuador, se registraron concentraciones elevadas de DQOT, DBO5, pH, fosfato, conductividad, amonio, nitrato y sodio en los ríos Machángara, Monjas, Guayllabamba, Chiche, Pisque y San Pedro, ríos que reciben constantes descargas de efluentes industriales y aguas servidas de las zonas

pobladas aledañas (Quilumbaqui, 2017). Esto evidencia claramente la necesidad de métodos de tratamiento efectivos, capaces de reducir las concentraciones de materia orgánica, nutrientes y metales tóxicos en aguas residuales a límites aceptables antes de su descarga y posterior reutilización. Es así que uno de los principales objetivos propuestos por las autoridades ecuatorianas en el año 2015 fue la intercepción de las descargas de aguas residuales antes de llegar a los cuerpos de agua natural y el tratamiento de las mismas, implementado proyectos como el de la planta de tratamiento de aguas residuales Vidobona en la provincia de Pichincha, sin embargo, su implementación está planificada para el año 2025 (Armijos et al., 2011).

1.2. Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales consiste en la combinación de operaciones y procesos físicos, químicos y/o biológicos para eliminar la concentración de sólidos, materia orgánica y nutrientes de las aguas residuales. Para describir los diferentes grados de tratamiento se utiliza generalmente los siguientes términos: tratamiento primario, secundario y terciario. El tratamiento primario está diseñado para eliminar los sólidos orgánicos e inorgánicos mediante el proceso físico de sedimentación. Durante esta etapa, el agua residual permanece en tanques inactivos en donde los sólidos pesados se depositarán al fondo, mientras que el líquido y los sólidos más ligeros serán sometidos a un tratamiento secundario (Sonune & Ghate, 2004). El tratamiento secundario tiene como objetivo la eliminación del material biológico disuelto y suspendido proveniente del efluente del tratamiento primario. Este proceso biológico está mediado, principalmente, por una población mixta de bacterias heterótrofas que utilizan la materia orgánica para la obtención de energía y crecimiento (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem, 2012). Generalmente, este proceso se lleva a cabo en reactores de biomasa fija en donde los compuestos orgánicos se adsorben en la biomasa y se degrada aeróbicamente, o en

reactores de biomasa en suspensión (i.e. Lodos activados, lagunas aireadas) en donde los microorganismos se mezclan libremente con las aguas residuales y se mantienen en suspensión mediante agitación (Abdel-Raouf et al., 2012; Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011). Un método bastante efectivo y ampliamente utilizado para el tratamiento secundario son los lodos activados con aireación extendida. En este tipo de tratamiento, además de la remoción de la materia orgánica, ocurre una reducción considerable de nitratos y nitritos, todo en un mismo reactor. Sin embargo, la calidad del efluente obtenido a partir de este tratamiento no siempre es óptima como para su posterior reutilización (Luna, 2014).

Debido a problemas como la eutrofización, las altas cargas de nitrógeno y fósforo inorgánicos generalmente presentes en el efluente secundario deben ser reducidas durante un tratamiento terciario. Para la eliminación del nitrógeno se ha reportado varios métodos que consisten en la combinación de procesos de nitrificación, desnitrificación y oxidación anaeróbica de amonio como la tecnología BABE (bio-augmentation batch enhanced), el proceso SHARON (single reactor system high activity ammonium removal over nitrite), el proceso ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation), entre otros (Guo, Stabnikov, & Ivanov, 2010). Sin embargo, estos procesos no pueden utilizarse para la remoción combinada de nitrógeno y fósforo. Para la eliminación del fósforo se utiliza principalmente la precipitación química con cloruro férrico o sulfato ferroso. Sin embargo, todos estos procesos resultan muy costosos y difíciles de implementar (Abdel-Raouf et al., 2012), sobre todo en países en vía de desarrollo en donde no se cuenta con los recursos necesarios para una adecuada implementación. En realidad, cada proceso de tratamiento adicional en un sistema de aguas residuales aumenta considerablemente el costo total. El costo relativo del tratamiento se duplica por cada proceso adicional luego del tratamiento primario (Abdel-Raouf et al., 2012).

1.3. El uso de microalgas en el tratamiento de aguas residuales

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, procariotas (cianobacterias) o eucariotas, capaces de convertir la energía solar en biomasa mediante la fijación de CO₂ (Guamán & Gonzáles, 2016). Estos microorganismos se encuentran presentes tanto en ecosistemas acuáticos como en ecosistemas terrestres, por lo que están sujetos a crecer bajo diversas condiciones ambientales, lo que a su vez permite encontrar una gran variedad de especies. En las últimas décadas, se ha propuesto la utilización de microalgas como solución a los altos costos y operaciones complejas implicadas en el tratamiento terciario convencional de aguas residuales (Renuka, Sood, Ratha, Prasanna, & Ahluwalia, 2013). El tratamiento biológico con microalgas resulta atractivo debido a sus capacidades fotosintéticas que permiten convertir la energía solar en biomasa, incorporando a su vez nutrientes como el nitrógeno y el fósforo que se encuentran presentes en las aguas residuales y que causan la eutrofización. La eliminación de nutrientes ocurre debido a la asimilación por parte de las microalgas en crecimiento. Diversos estudios han reportado además que, cuando el pH es elevado inducido por la fotosíntesis, suceden también otros fenómenos como la volatilización del amoníaco y la precipitación del fósforo (Larsdotter, 2006). La principal ventaja del uso de microalgas en el tratamiento de aguas residuales es el potencial ahorro en costos operacionales y de infraestructura, y por ende representa un enfoque atractivo sobretodo para los países en desarrollo. La generación de O₂ durante la fotosíntesis reduce la necesidad y, por lo tanto, el alto costo operativo de la aireación mecánica de los tanques tradicionales de tratamiento (Pittman, Dean, & Osundeko, 2011). Por otra parte, el tratamiento de aguas residuales con microalgas es mucho más amigable con el medio ambiente ya que no se generan contaminantes adicionales, como las grandes cantidades de lodo que requieren de tratamiento adicional, y brinda una oportunidad para la asimilación eficiente de nutrientes. Por ejemplo, la biomasa de algas ricas en N y P recuperada puede usarse para la producción de bioenergía, biofertilizantes,

piensos (alimentos elaborados para animales) y otros productos de interés (Gonçalves et al., 2017; Pittman et al., 2011). Por lo tanto, esta alternativa al tratamiento convencional conduce al aprovechamiento completo de los recursos naturales y puede generar réditos económicos para la operación global.

1.4. Consorcios de microalgas en el tratamiento de aguas residuales

La mayor parte de estudios acerca del tratamiento de aguas residuales con microalgas ha sido realizada utilizando especies puras. Entre los géneros más utilizados se encuentran *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Nannochloris*, *Botryococcus* y *Phormidium*. Los porcentajes de remoción de nutrientes obtenidos utilizando especies puras han sido variados, con porcentajes que oscilan entre 52 – 95% para el nitrógeno y 20 – 67% para el fósforo. (Aslan & Kapdan, 2006) (González, Cañizares, & Baena, 1997) (Benítez et al., 2018). No obstante, en la naturaleza, la mayoría de especies de microalgas se encuentran en asociación con otros organismos aeróbicos y anaeróbicos, asociación que implica una gran cantidad de interacciones simbióticas que pueden ser aprovechadas para los procesos de biorremediación. La importancia y eficiencia de los consorcios de microalgas (microalgas y microalgas-bacteria), en comparación con los cultivos puros ha sido ilustrada en varios estudios en donde se ha obtenido porcentajes de remoción de nutrientes que superan los porcentajes obtenidos a partir del uso de cepas puras (remoción > 92% para el nitrógeno y > 80% para el fósforo y carbono) (Alcántara, Fernández, García-Encina, & Muñoz, 2015; De Godos, González, Becares, García-Encina, & Muñoz, 2009; Hernández, Riaño, Coca, & García-González, 2013). Específicamente, en los consorcios microalga-bacteria se puede observar una relación simbiótica que permite a estos microorganismos (microalgas y bacterias), aumentar su crecimiento y por tanto mejorar las tasas de absorción de nutrientes. Las microalgas liberan compuestos orgánicos durante la fotosíntesis que pueden ser aprovechados por las bacterias como fuente de carbono y energía, y el O₂ que

se utiliza como aceptor de electrones para degradar la materia orgánica. Asimismo, las bacterias liberan CO₂ que puede ser aprovechado para las reacciones fotosintéticas de las microalgas (Gonçalves et al., 2017; Subashchandrabose, Ramakrishnan, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2011). Sin embargo, las interacciones cooperativas van más allá que el simple intercambio de nutrientes, los consorcios representan sistemas más robustos, capaces de resistir las fluctuaciones ambientales y la invasión de otras especies; además presentan una amplia especificidad a diferentes nutrientes que resultan en mayores eficiencias de remoción de compuestos y finalmente, al ser utilizados en fases de tratamiento secundarios, pueden reducir los costos de oxigenación y emisiones de CO₂ (Gonçalves et al., 2017).

Por otra parte, se ha visto un interés reciente en la detección de microalgas nativas prometedoras que no solo tengan el potencial de asimilar nutrientes del agua residual, sino que también puedan formar consorcios con aplicaciones de biomasa mucho más amplias luego de su recolección en sitios contaminados (Renuka et al., 2013). Estudios demuestran que, generalmente, las cepas nativas de microalgas se adaptan mejor al ambiente local y muestran tasas de crecimiento mayores en comparación con microalgas que han sido introducidas. Asimismo, se sabe que las cepas nativas tienen un mayor potencial para crecer en aguas residuales con alto contenido de carbono, nitrógeno y fósforo, y tienden a agregarse y exhibir auto-sedimentación sin la necesidad de añadir ningún floculante (Zhou et al., 2012). Estas características obtenidas probablemente debido a la necesidad de supervivencia de estos microorganismos en diversos ecosistemas, representan un gran potencial en el campo de la biorremediación. Incluso, este potencial biorremediador podría verse incrementado tomando en cuenta el alto índice de biodiversidad del Ecuador que, en realidad, a nivel de microorganismos ha sido muy poco estudiado (Guamán & Gonzáles, 2016). Por ende, resultaría oportuno el aprovechamiento de las distintas capacidades y el gran potencial de

biorremediación de los consorcios nativos para el desarrollo de un sistema ideal de tratamiento de aguas residuales en el país.

1.5. Estudio de la composición y dinámica de comunidades de microalgas.

A pesar de que varios estudios han aplicado de manera exitosa consorcios microalga-bacteria para la remoción de nutrientes de distintas fuentes de aguas residuales, se requiere más investigación en cuanto al ecosistema y comprensión de la dinámica de las comunidades que componen estos consorcios, mas aún si se trata de consorcios nativos de los cuales se tiene muy poca información. El advenimiento de la metagenómica ha conducido a avances significativos en el estudio de la abundancia, diversidad e interacciones que tienen lugar en los diversos ecosistemas microbianos (Cooper & Smith, 2015); enfoque que constituye el primer paso hacia la aplicación del concepto de ingeniería ecológica a los procesos de biorremediación con microalgas, que resulta a su vez en el desarrollo de sistemas de tratamiento más efectivos (Gonçalves et al., 2017). Asimismo, los avances en los métodos de secuenciación permiten una secuenciación más rápida y económica que resulta en millones de lecturas y ofrece información sobre el mundo de los microorganismos que actualmente no se pueden cultivar (Jones, 2018). Se conoce que la mayoría de los microorganismos de la Tierra no son cultivables, por lo que la diversidad de las comunidades bacterianas complejas se subestima inevitablemente utilizando métodos de cultivo estándar (Vartoukian, Palmer, & Wade, 2010). Dentro de la razones por las cuales ciertos microorganismos resultan difíciles de cultivar en condiciones *in vitro* están: (i) organismos para los cuales no están disponibles los requisitos específicos de crecimiento, (ii) organismos de crecimiento lento y (iii) organismos lesionados que no pueden soportar las condiciones estresantes impuestas en un determinado cultivo (Vartoukian et al., 2010; Vaz-Moreira, Egas, Nunes, & Manaia, 2011). Además, las microalgas son en su mayoría

muy pequeñas y carecen de rasgos morfológicos distintivos, lo que hace que los análisis dependientes de cultivo sean generalmente dificultosos (Zimmer & Roalson, 2005). No obstante, los análisis basados en técnicas de cultivo están lejos de ser redundantes para la evaluación de comunidades bacterianas a pesar de la disponibilidad de diversos métodos moleculares actuales. Para comprender el alcance total de la diversidad microbiana dentro de una comunidad, resulta necesario implementar estrategias integrales que incluyan tanto técnicas tradicionales de cultivo como técnicas moleculares independientes de cultivo (Donachie, Foster, & Brown, 2007). Los métodos de cultivo siguen siendo de gran importancia sobre todo para hacer inferencias sobre las propiedades fisiológicas y metabólicas de los organismos (Vaz-Moreira et al., 2011). Incluso, existen estudios que demuestran que los métodos de cultivo son críticos en análisis de diversidad ya que detectan organismos no detectados por técnicas moleculares (Donachie et al., 2007). Por lo tanto, un enfoque complementario de ambas técnicas, dependientes e independientes de cultivo permitirá realizar análisis más robustos que no solo detecten aquellos microorganismos cultivables, sino también a aquellos no cultivables y aquellos que se pueden pasar por alto mediante técnicas moleculares.

1.6. Métodos de secuenciación para estudios de diversidad de comunidades.

Dentro de los distintos métodos de secuenciación que existen actualmente para determinar la diversidad de comunidades bacterianas, la mayoría dependen principalmente de la secuenciación basada en Illumina de regiones cortas hipervariables del 16S rRNA. Si bien la profundidad y precisión de la secuenciación de Illumina tienen grandes ventajas sobre otros métodos de secuenciación, la longitud de las lecturas es limitada y puede conducir a sesgos

analíticos, dependiendo de la complejidad de la comunidad bacteriana (Shin et al., 2018). Para superar esta limitación, se ha utilizado recientemente plataformas de secuenciación de lectura larga, como MinION y PacBio. Las lecturas largas alcanzadas por estas plataformas permiten una caracterización más detallada de la comunidad bacteriana, hasta nivel de familia, e incluso a veces hasta nivel de género y especie (Shin et al., 2018).

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo caracterizar la diversidad microbiana de consorcios nativos de Lago Agrio, Ecuador con potencial de biorremediación de aguas residuales, con un enfoque en la composición y diversidad de microalgas presentes en los mismos. Además, con el fin de analizar la capacidad y complementariedad de las técnicas dependientes de cultivo y técnicas independientes de cultivo en estudios de diversidad de este tipo, se ha utilizado un medio de cultivo sintético para microalgas modificado a partir del medio BG-11 para el cultivo de los consorcios y su posterior caracterización y comparación con técnicas de última generación, en este caso con el análisis metagenómico a partir de lecturas generadas en la plataforma MinION.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Caracterizar la composición de las comunidades de microalgas de consorcios nativos de Lago Agrio, Ecuador, mediante técnicas tradicionales y técnicas de secuenciación última generación, y relacionarla con su capacidad remediadora.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Identificar y determinar la abundancia y diversidad de microalgas cultivables presentes en la microbiota de consorcios nativos de Lago Agrio, Ecuador con capacidad remediadora.
- 2.2.2. Determinar la abundancia y diversidad de la microbiota presente en consorcios nativos de Lago Agrio, Ecuador mediante análisis metagenómicos.
- 2.2.3. Comparar la composición de las comunidades microalgales obtenidas mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo y técnicas moleculares de última generación.
- 2.2.4. Comparar la biodiversidad y abundancia de microalgas de los distintos consorcios evaluados y relacionarla con su capacidad remediadora.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Para la realización del presente proyecto se utilizaron 5 consorcios microbianos nativos de Lago Agrio, Ecuador recolectados en 5 localidades diferentes con las siguientes coordenadas geográficas: (1) 00.12714, -76.84980; (2) 00.11993, -76.85534; (3) 00.10895, -76.87162; (4) 00.10909, -76.87186 y (5) 00.10943, -76.87168. La crioconservación, siembra, extracción de ADN de los consorcios y análisis de datos se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ), campus Cumbayá (Ecuador). La secuenciación del ADN extraído de los consorcios microbianos estuvo a cargo de Linda Kode, técnica del laboratorio de biología molecular del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad de Wageningen (Wageningen, Países Bajos). Finalmente, el análisis

metagenómico y bioinformático se llevó a cabo en el Centro de Bioinformática de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá (Ecuador).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a los problemas ambientales como la eutrofización e incluso las preocupaciones de salud generadas por los grandes volúmenes de aguas residuales que son descargadas directamente en los cuerpos de agua, resulta necesario el estudio de estrategias eficaces, robustas y económicamente rentables para el tratamiento de las aguas residuales antes de su descarga y posterior reutilización. A pesar de que existen actualmente varios métodos químicos, físicos y biológicos para el tratamiento de aguas residuales, la utilización de consorcios microalga-bacteria representa una alternativa atractiva; sin embargo, poco estudiada y profundizada. Asimismo, el conocimiento a nivel mundial de la biodiversidad de microalgas es bastante escaso, incluso más en el Ecuador. Por lo tanto, su estudio es muy importante tomando en cuenta que además, el Ecuador es considerado un país megadiverso y sus diferentes condiciones geográficas, climatológicas y físico-químicas podrían generar la condiciones adecuadas para el crecimiento de todo tipo de microalgas. Es por esta razón que, la caracterización de microalgas potenciales para el tratamiento de aguas residuales podría llevar incluso a la identificación de nuevas cepas o especies y permitirá un mejor entendimiento de la complejidad y diversidad de las comunidades en estudio, y su relación con la capacidad remediadora. Los beneficiarios de este estudio serán para la comunidad científica y la población en general debido al aporte de nuevo conocimiento acerca de la diversidad y complejidad de los

consorcios microalga-bacteria, específicamente de aquellas especies con potencial para el tratamiento de aguas residuales y otros procesos de biorremediación.

5. MATERIALES

5.1. Consorcios microalga-bacteria

- 5 consorcios microalga-bacteria recolectados en 5 localidades distintas en Lago Agrio, Ecuador

5.2. Medio de cultivo BG-11 modificado

- Nitrato de potasio - KNO_3
- Fosfato de sodio dibásico - Na_2HPO_4
- Sulfato de magnesio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de calcio - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Ácido cítrico - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- Sulfato de hierro (II) - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- EDTA - $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$
- Bicarbonato de sodio - NaHCO_3
- Ácido bórico - H_3BO_3
- Sulfato de magnesio - $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de zinc - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Molibdato de sodio - $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

- Cloruro de cobalto (II) - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Agua destilada

5.3. Crioconservación de consorcios

- DMSO 20%
- Medio BG-11 modificado
- Consorcios microalga-bacteria nativos de Lago Agrio, Ecuador.
- Crioviales estériles de 2000 μL

5.4. Identificación microalgas cultivables

- Medio BG-11 modificado
- Agar
- Matraces Erlenmeyer de 100 mL
- Cajas Petri
- Microscopio óptico

5.5. Extracción ADN total de consorcios, cuantificación y electroforesis en gel de agarosa

- Kit DNeasy Power Soil Total DNA (Qiagen)
- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Ultra PureTM Agarose (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris-base ácido bórico- EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Ultra PureTM Distilled Water (GIBCO)

- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- Cámara de electrophoresis Enduro Gel WL (Labnet International)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad)

5.6. Secuenciación ADN total de consorcios

- MinION™ device
- SpotON flow cells
- MinION™ sequencing kit
- Software Mentrichor
- poRe package

5.7. Análisis estadístico

- Software R versión 3.5.2
- Vegan package versión 2.5-4
- Prism 8 versión 8.0.2

5.8. Análisis bioinformático

- FastQC software
- MultiQC software
- Kaiju Web Server

6. MÉTODOS

6.1. Preparación medio de cultivo BG-11

La composición del medio líquido BG-11 modificado utilizado para el cultivo de microalgas fue: 1500 mg L⁻¹ KNO₃, 40 mg L⁻¹ Na₂HPO₄, 75 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 36 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 6 mg L⁻¹ ácido cítrico, 6 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 1 mg L⁻¹ EDTA, 20 mg L⁻¹ NaHCO₃, 2.86 mg L⁻¹ H₃BO₃, 1.81 mg L⁻¹ MnSO₄·7H₂O, 0.22 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0.39 mg L⁻¹ NaMoO₄·2H₂O, 0.08 mg L⁻¹ CuSO₄·5H₂O y 0.05 mg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O. Para realizar el medio sólido se utiliza la misma composición y se adiciona 15 g L⁻¹ de agar. Tanto el medio líquido como el medio sólido fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121°C previo a su uso.

6.2. Selección y crioconservación de consorcios

Luego de haber realizado ensayos de biorremediación en estudios posteriores con 12 consorcios nativos de Lago Agrio, Ecuador, se seleccionaron los 5 consorcios más eficientes en cuanto a remoción de nutrientes y materia orgánica. Los consorcios seleccionados fueron: M22, M14, M1B, M2 y M5. Asimismo, luego de los ensayos de biorremediación, estos consorcios fueron crioconservados en crioviales estériles de 2000 µL añadiendo 800 µL de cada consorcio, 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) al 20%, 800 µL de medio líquido BG-11 modificado, se mezcló con un agitador tipo vortex y conservó a -80°C.

6.3. Identificación de microalgas cultivables

6.3.1. Siembra, cuantificación e identificación de microalgas cultivables

Cada consorcio crioconservado fue suspendido en 20 mL de medio líquido BG-11 modificado en matraces Erlenmeyer para su activación durante 8 días. Luego de los 8 días se realizó diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) y se sembró cada dilución por triplicado mediante el método de extensión en placa en cajas Petri que contenían medio sólido BG-11 modificado. Las cajas Petri fueron incubadas durante 30 días a 23°C y fotoperiodo (12h luz: 12h oscuridad). Se determinó el tamaño de la población microalgal mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en aquellas cajas en donde se encuentren entre 20 y 300 colonias por caja para las microalgas unicelulares y entre 0-30 colonias por caja para las microalgas filamentosas. Además, se identificó las microalgas morfológicamente al nivel taxonómico más bajo posible mediante el uso de claves taxonómicas.

6.3.2. Análisis estadístico

Se determinó la α -diversidad (índice de Shannon-Weiner y Simpson) y β -diversidad (índice de Jaccard y Bray-Curtis) en base a los resultados de UFCs de los consorcios y los diferentes morfotipos de microalgas encontradas durante la identificación de las microalgas cultivables. Se utilizó el software R versión 3.5.2 con el paquete vegan versión 2.5-4.

6.4. Análisis metagenómico

6.4.1. Extracción ADN total de los consorcios

Para la extracción del ADN total de los consorcios se utilizó el Kit DNeasy Power Soil Total DNA (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante a excepción del

cuarto paso en donde se incrementó del tiempo de agitación en vortex a 45 min. Se evaluó la concentración, pureza del ADN extraído con un espectrofotómetro Nano Drop y se analizó la calidad y pureza de la elución en términos de la presencia de ácidos húmicos (relación 260nm/230nm) y contaminantes proteínicos (260nm/280nm). Adicionalmente se realizó un gel de agarosa al 2% del ADN extraído y se visualizó bajo luz ultravioleta para confirmar la presencia del ADN.

6.4.2. Secuenciación ADN total de los consorcios

Las muestras de ADN de cada consorcio fueron secuenciadas según las instrucciones de Oxford Nanopore Technologies para el MinION Starter Pack Enhanced Support Version equipado con SpotON Flow Cells (ONT, Reino Unido). Las secuencias sin formato generadas por el MinION se invocaron en tiempo real utilizando el paquete de software Mentrichor (ONT, Reino Unido) y fueron transformadas en archivos universales FASTA mediante poRe.

6.4.3. Análisis bioinformático

Se utilizó el software FastQC para analizar la calidad de los datos resultantes de la secuenciación (Andrews, 2010). Para esto se importó los datos en formato FASTA y se exportó los resultados a manera de un informe HTML. Posteriormente, se utilizó el software MultiQC con el fin de crear un solo informe con gráficos interactivos y el resumen de las estadísticas de calidad de las muestras secuenciadas (Ewels, Magnusson, Lundin, & Käller, 2016).

Una vez realizado el control de calidad, se utilizó el servidor web Kaiju para la clasificación taxonómica de las lecturas. Dentro de las opciones de Kaiju se escogió el modo Greedy con el filtro SEG, longitud de coincidencia mínima=11, puntuación de coincidencia mínima=75, y desajustes permitidos=5 (Menzel, Ng, & Krogh, 2016). La base de datos de referencia

seleccionada fue NCBI BLAST *nr+euk* (103 M de secuencias de proteínas *nr* de Bacterias, Arqueas, Virus, Hongos y eucariotas microbianos).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis del cultivo tradicional

7.1.1. Composición de microalgas

De forma general, en los 5 consorcios analizados se logró identificar un total de 12 morfotipos distintos. Estos morfotipos de microalgas identificados mediante cultivo tradicional pertenecieron estrictamente a dos filos: *Chlorophyta* y *Cyanobacteria* que estuvieron presentes en todos los consorcios. La identificación microscópica a nivel de género o especie no fue siempre posible. Los posibles géneros identificados en el presente estudio fueron: *Pseudanabaena*, *Leptolyngbya* y *Synechocystis*; sin embargo, dentro de los géneros *Pseudanabaena* y *Leptolyngbya*, se pudo identificar claramente la presencia de especies distintas de acuerdo a los rasgos morfológicos observados bajo el microscopio (Figura 1). No obstante, 5 morfotipos específicos no pudieron ser clasificados a nivel de género o especie por lo que se les clasificó a niveles taxonómicos más altos como familia (*Leptolyngbyaceae*, *Pseudanabanaceae*), orden (*Synechococcales*) o división (*Chlorophyta*, *Cyanobacteria*) (Figura 1). Con el fin de tener una clasificación más homogénea para los posteriores análisis de diversidad, se clasificó los morfotipos de microalgas encontrados durante el cultivo a niveles taxonómicos de familia o superior. Como se puede observar en la Tabla 1, cada consorcio presentó una composición distinta de estas familias, representados como unidades formadoras

de colonia (UFC). *Chlorophyta* fue el grupo más dominante en la mayor parte de los consorcios a excepción del consorcio M2 que estaba dominado por microalgas del filo *Cyanobacteria*. En los consorcios M1B, M14A, M5 y M22B, el porcentaje de microalgas *Chlorophyta* fue de 87.98%, 99.81%, 95.42% y 99.43%, respectivamente; mientras que el consorcio M2 presentó una mayor abundancia de cianobacterias, específicamente de la familia *Merismopediaceae* (61.75%), seguido de *Chlorophyta* (22.67%) y microalgas no clasificadas pertenecientes al orden *Synechococcales* (14.60%) (Figura 2).

7.1.2. Diversidad de microalgas cultivables

De acuerdo al índice de Simpson, los 5 consorcios analizados presentaron valores entre 0.004 y 0.546. El menor (0.004) se presentó para el consorcio M14 mientras que el mayor valor (0.546) se presentó para el consorcio M2 (Tabla 2). Este índice, en comparación con el índice de Shannon, no se ve afectado por las especies raras o poco abundantes. Así, el índice de Shannon le da más peso a la riqueza de especies, incluyendo aquellas muy raras. No obstante, ambos índices son ampliamente utilizados para análisis de biodiversidad de muestras o hábitats y ambos toman en cuenta tanto la riqueza de especies (número de especies), como la abundancia relativa de cada especie (proporción de individuos de una especie con respecto al total de individuos) (Brraich & Kaur, 2015). El rango de valores para el índice de Shannon (H') fue entre 0.015 y 0.960. Al igual que el índice de Simpson, el consorcio M14 registró el valor más bajo (0.015) mientras que el consorcio M2 registró el valor más alto (0.960) (Tabla 2). Ambos índices demuestran muy baja diversidad de microalgas en todos los consorcios. Valores menores a 2 para el índice de Shannon y menores a 0.7 para el índice de Simpson son considerados bajos en estudios de diversidad de las comunidades de algas en tratamientos de biorremediación (Renuka, Sood, Prasanna, & Ahluwalia, 2014; Sardi Saavedra, Pena Salamanca, Madera Parra, & Ceron Hernandez, 2016). Estos valores relativamente bajos de

diversidad podrían estar explicados por la abundancia de una especie sobre las otras en la mayoría de los consorcios y el bajo número de especies distintas registradas para cada consorcio (promedio de 3 especies por consorcio).

7.2. Análisis metagenómico

7.2.1. Extracción y secuenciación del ADN total

Se logró extraer ADN de los 5 consorcios que se encontraban en medio líquido BG-11 modificado. La cuantificación del ADN mostró concentraciones entre 45.70 y 127.00 ng/ μ L y una pureza adecuada en base a la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 (Anexo 1). Asimismo, se evaluó la presencia e integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con lo que se pudo evidenciar la presencia de bandas claras para todos los consorcios (Anexo 2).

Las lecturas del MinION mostraron un Phred quality score promedio de 12.5 para todas las muestras (Anexo 3) y mediante el software de alineación Kaiju se logró clasificar con éxito entre el 32 y 67% de las lecturas con la base de datos de referencia (NCBI BLAST *nr+euk*) (Tabla 4).

7.2.2. Diversidad de microalgas

Al igual que el análisis de diversidad de la técnica dependiente de cultivo y debido a la gran cantidad de especies clasificadas mediante Kaiju Web Server, se determinó la diversidad de microalgas en base a la categoría taxonómica de familia. Por lo tanto, se identificaron entre 33 y 34 familias de microalgas procariotas (cianobacterias), y entre 40 y 85 familias de microalgas eucariotas. Los índices de diversidad de Shannon y Simpson variaron entre 1.339 – 2.878 y

0.401 – 0.904 respectivamente (Tabla 3). Con respecto al índice de Shannon, el consorcio M14A presentó una baja diversidad de microalgas ($H' = 1.339$), mientras que los consorcios M1B, M2, M5 y M22B presentaron una diversidad normal ya que los valores para este índice oscilaron entre 2 y 3. Es decir, estos consorcios poseen una riqueza de familias de microalgas considerada normal para este tipo de comunidades. Por otra parte, con relación al índice de Simpson, el consorcio M14A mostró una diversidad baja ($D = 0.401$), mientras que los consorcios M1B, M2, M5 y M22B tuvieron una alta diversidad, con valores entre 0.820 y 0.904. Es importante mencionar que, a diferencia del índice de Shannon, este último, al tener valores cercanos a 1, implica una distribución más uniforme de individuos entre las especies, en este caso entre familias de microalgas.

Los filos de microalgas más representados, es decir, aquellos que fueron asignados el mayor número de lecturas, fueron *Chlorophyta* y *Cyanobacteria*. De forma general, incluyendo bacterias, eucariotas, arqueas y virus; los porcentajes de lecturas de secuencia asignadas a *Cyanobacteria* en los consorcios tuvieron un promedio de 11.46% (mínimo 0.3% en M22B y máximo 29% en M14A) y un promedio de 3% de lecturas de secuencia asignadas a *Chlorophyta* (mínimo 1% en M2 y máximo 6% en M1B) (Tabla 4). Con el objetivo de identificar aquellos géneros más abundantes, se tomó en consideración los géneros que representaban más del 2% del total de lecturas asignadas a microalgas por cada consorcio. Como se observa en la Figura 3, los consorcios resultaron tener una composición y abundancia distinta de microalgas. El consorcio 1B tuvo mayor abundancia de los géneros *Tetradasmus* (20%), *Monoraphidium* (18%), y *Geminocystis* (17%). La microalga más abundante a nivel de género del consorcio M2 fue *Pseudanabaena* (28%), en el consorcio M14A fue *Leptolyngbya* (89%), en el consorcio M5 tuvo una mayor abundancia *Synechococcus* (48%) y por último el consorcio M22B tuvo una mayor abundancia del género *Chlorella* (41%) (Figura 3). Otros

géneros comúnmente presentes en los 5 consorcios fueron *Synechocystis*, *Nostoc*, *Volvox*, *Chlamydomonas* y otros miembros de los filos *Cyanobacteria* y *Chlorophyta* que no pudieron ser clasificados a nivel de género durante la asignación taxonómica en el servidor web de Kaiju (Unclassified *Cyanobacteria* and *Chlorophyta*).

7.2.3. Comunidad bacteriana

En el presente estudio, casi todas las secuencias clasificadas de los 5 consorcios fueron asignadas a bacterias (93-97%) y un porcentaje menor fueron asignadas a eucariotas microbianos (2-10%), arqueas (0.09-0.4%) y virus (0.01-0.09%) (Tabla 4). Dentro de las bacterias, el filo más abundante fue *Proteobacteria* con 54% de las secuencias clasificadas en promedio (mínimo 42% en M14A y máximo 64% en M22B). Otros filos de bacterias importantes también representados en los consorcios fueron *Cyanobacteria* (media 11.86%, cada consorcio 0.3-31%), *Bacteroidetes* (9.8%, 2-24%), *Actinobacteria* (4.2%, 2-7%), *Acidobacteria* (4.2%, 1-13%), *Planctomycetes* (3%, 2-4%) y *Firmicutes* (2.2%, 1-3%) (Figura 4). En términos del filo más predominante, en este caso *Proteobacteria*, la estructura de la comunidad de los 5 consorcios fue similar. Asimismo, la clase dominante dentro de *Proteobacteria* fue α -*Proteobacteria* en todas las muestras, con porcentajes que oscilaron entre 44% y 63% del total de *Proteobacteria*. Los porcentajes de γ -*Proteobacteria* estuvieron entre 12% y 30% y β -*Proteobacteria* entre 6% y 23%, siendo en ciertos consorcios γ -*Proteobacteria* más abundante que β -*Proteobacteria* (M1B, M14A y M5) y en otros (M2 y M22B) β -*Proteobacteria* más abundante que γ -*Proteobacteria* (Figura 5). Dentro de estos filos y clases, algunos géneros importantes que estuvieron presentes con una abundancia $\geq 2\%$ de la abundancia total de microorganismos fueron *Hypomicrobium* (2% en M1B), *Escherichia* (6% en M1B, 4% en M5, 3% en M2 y M14, y 2% en M22B), *Elioraea* (5% en M2 y 2% en M5), *Phenylobacterium* (2% en M2), *Arenimonas* (3% en M14A), *Sphingopyxis* (13% en M22B y

2% en M5), *Azospirillum* (3% en M22B), *Roseomonas* (2% en M22B), *Pseudoxanthomonas* (2% en M22B) y *Sediminibacterium* (2% en M22B). De manera general, en todos los consorcios hubo una abundancia relativamente alta del género *Escherichia* específicamente de las especies *Escherichia coli* y *Escherichia marmotae*.

8. DISCUSIÓN

8.1. Comparación técnicas tradicionales dependientes de cultivo con técnicas moleculares

Los resultados obtenidos mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo fueron diferentes a los resultados obtenidos mediante la técnica de secuenciación de última generación utilizada en el presente trabajo de investigación. Como se observó, el número de morfotipos de microalgas cultivables identificadas fueron tan solo 12, mientras que en el análisis metagenómico se identificó 119 familias de microalgas, dentro de las cuales se encuentran una gran variedad de especies. Debido a esta gran diferencia, los valores de diversidad obtenidos mediante ambas técnicas también fueron distintos. Así, en el análisis de microalgas cultivables los índices de Simpson y Shannon fueron extremadamente bajos (entre 0.004 - 0.546, y 0.015 - 0.960 respectivamente), mientras que en el análisis metagenómico los índices fueron mayores, variando entre 0.401 – 0.904 y 1.340 – 2.878 respectivamente. Sin embargo, estas diferencias podrían explicarse por algunas limitaciones intrínsecas de la metodología utilizada para la técnica dependiente de cultivo. Como ya se mencionó, no todos los morfotipos pudieron ser clasificados al mismo nivel taxonómico (i.e., en este caso familia) para los análisis de diversidad, por lo que algunos morfotipos se les asignó a niveles taxonómicos más altos como

orden o división, dentro de los cuales podrían haberse encontrado varias familias. En general, las microalgas son muy difíciles de detectar mediante técnicas de cultivo tradicionales debido al tamaño y carencia de rasgos morfológicos distintivos (Zimmer & Roalson, 2005). Específicamente, la división *Chlorophyta* posee una alta plasticidad morfológica que normalmente resulta en dificultades para identificar a nivel de género o especie mediante microscopía (Fistarol et al., 2018). De hecho, estudios han demostrado que la morfología de ciertas microalgas podría depender de factores ambientales y varía significativamente según las condiciones ambientales en las que se encuentren, lo que podría llevar a una identificación incierta, especialmente con muestras ambientales mediante microscopía óptica (Darienکو, Gustavs, Eggert, Wolf, & Pröschold, 2015).

Por otra parte, teniendo en consideración que los índices de Simpson y Shannon no solo toman en cuenta la riqueza de especies presentes, sino también la abundancia y uniformidad de las mismas (Brraich & Kaur, 2015), los valores de diversidad bajos determinados mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo pueden estar relacionados con la baja abundancia de microalgas filamentosas reportadas en la presente investigación. No obstante, las microalgas filamentosas, todas pertenecientes al filo *Cyanobacteria*, podrían haber estado subrepresentadas debido a la unidad de conteo utilizada en la presente investigación. Las unidades de conteo para colonias y microalgas filamentosas fue la misma: unidades formadoras de colonias (UFC); sin embargo, varios estudios mencionan que para el caso de microalgas filamentosas, el conteo podría resultar más preciso si se lo realiza por número de filamentos, tomando en cuenta además la longitud y diámetro de éstos para determinar el número total de células por filamento (Brierley, Carvalho, Davies, & Krokowski, 2007). Es así que en ciertas cajas Petri las microalgas filamentos parecían ser más abundantes que las microalgas unicelulares, sin embargo, los números de UFCs no reflejaban estas diferencias. Debido al gran

número de filamentos presentes, a menudo difíciles de distinguir, y por falta de materiales que permitan un análisis más exhaustivo de estos filamentos (i.e. Microscopio fluorescente, rejillas de recuento) no pudo llevarse a cabo esta metodología. Por lo tanto, como los gráficos de la abundancia de microalgas cultivables lo indican (Figura 2), la mayoría de los consorcios analizados estuvieron dominados, con porcentajes mayores al 90%, por miembros unicelulares de la división *Chlorophyta*.

En general, mediante las técnicas dependientes de cultivo, pudo identificarse tan solo una pequeña fracción de la totalidad de microalgas presentes en los consorcios analizados, confirmando así el hecho de que solo un pequeño porcentaje de la totalidad de microorganismos de la Tierra es cultivable fácilmente en condiciones *in vitro* (Vartoukian et al., 2010). Como ya se mencionó, esto puede estar dado por varias razones: 1) los requisitos específicos de crecimiento de ciertos organismos podrían no estar disponibles en el medio escogido; 2) son organismos de crecimiento lento que pueden pasar desapercibidos durante el análisis microscopio; o 3) las condiciones de estrés impuestas por la técnica de cultivo podrían ser tantas que impidan el crecimiento de ciertos microorganismos (Vaz-Moreira et al., 2011). De igual forma, si la abundancia de ciertos microorganismos es muy baja, la probabilidad de que las células sean escogidas y por lo tanto crezcan en el medio sólido es igualmente menor (Fistarol et al., 2018). Debido a estas limitaciones de las técnicas dependientes de cultivo, en la actualidad las técnicas moleculares han tomado mucha importancia y han resultado además ser superiores en estudios de diversidad de este tipo. Específicamente, las plataformas de secuenciación de lectura larga como MinION permiten una caracterización más detallada de la comunidad de microorganismos a niveles taxonómicos bajos (Shin et al., 2018). No obstante, las técnicas tradicionales dependientes de cultivo no dejan de ser importantes. En el presente estudio fue importante determinar aquellas microalgas capaces de crecer en medio sólido lo

que facilitará la obtención de cultivos puros para futuros estudios y la caracterización completa a nivel fisiológico de cada una de ellas. Pues a pesar de que el aislamiento de microorganismos para la obtención de cultivos puros también puede realizarse en medios líquidos, en realidad resulta imposible si éstos no son predominantes en el material de partida (Taubeneck, 2007). Un resultado importante del análisis metagenómico es el alto porcentaje de microorganismos que no pudieron ser clasificados (33-68% unclassified reads). Este hecho puede surgir debido a la enorme diversidad microbiana que probablemente existe en estos consorcios Amazónicos tomados en Lago Agrio, Ecuador y habla mucho además del potencial de estos ecosistemas para futuras investigaciones. La caracterización de comunidades microbianas de muestras ambientales y/o consorcios para el tratamiento de aguas residuales mediante la secuenciación de microbiomas completos en plataformas como MinION es inexistente, por lo que poco se sabe acerca de si estos porcentajes de lecturas clasificadas son o no aceptables. Sin embargo, al tratarse de muestras ambientales y un entorno que carece de organismos bien caracterizados, los porcentajes de lecturas no clasificadas parecen ser coherentes. Por ejemplo, un estudio de la comunidad bacteriana en muestras marinas no exploradas mediante secuenciación del 16S en Illumina mostró valores de lecturas no clasificadas de hasta 45% (Aravindraja, Viszwapriya, & Karutha Pandian, 2013). Además, el puntaje promedio de calidad Phred de las lecturas obtenidas en la presente investigación (12.5) fue muy similar a otros estudios que utilizan lecturas en MinION (Shin et al., 2018) y el programa utilizado para la asignación taxonómica Kaiju, es uno con los porcentajes de clasificación más altos comparado con otros programas como Kraken y taxMaps (Corvelo, Clarke, Robine, & Zody, 2018). Por lo tanto, los porcentajes de lecturas no clasificadas parecen tener relación con la naturaleza de los consorcios más que con la calidad de las lecturas o el programa utilizado para clasificarlos.

8.2. Microalgas, comunidad bacteriana y potencial de biorremediación

La mayor parte de estudios acerca del tratamiento de aguas residuales con microalgas se centran en reportar la reducción en la carga de nutrientes obtenida, mas no en resaltar por qué ciertos tratamientos resultaron ser más eficaces. Asimismo, varios estudios no explican si las aguas residuales han sido esterilizadas antes de realizar los ensayos de biorremediación, por lo tanto es difícil determinar cuales son las contribuciones relativas de las microalgas y bacterias que forman parte del consorcio en el rendimiento del tratamiento (Ceballos et al., 2018). Es por esta razón que en la presente investigación se utilizó un medio de cultivo minimal estándar (BG-11 modificado), evitando así posibles interferencias con microorganismos que se encuentran en el agua residual con el objetivo de determinar la biodiversidad presente en cada consorcio y analizar su relación con la eficiencia en el tratamiento de aguas residuales. No obstante, el hecho de haber utilizado este medio de cultivo podría haber introducido un sesgo hacia microalgas, especialmente cianobacterias. El medio BG-11 fue diseñado en un principio para el cultivo de cianobacterias ya sea de agua dulce, suelo u origen termal (Stanier, Deruelles, Rippka, Herdman, & Waterbury, 1979). Sin embargo, en la actualidad ha sido utilizado también para ciertas microalgas eucariotas y en general para algas de agua dulce y protozoos (Aguilera & Amils, 2005; Flores-Moya et al., 2005). Aun así, debido al interés en la biodiversidad y detección de microalgas promisorias para el tratamiento de aguas residuales, se determinó óptimo el uso de este medio de cultivo para el presente proyecto.

La diversidad de microalgas en los distintos consorcios fue muy variada como se pudo observar en los análisis metagenómicos. De acuerdo a los índices de Shannon y Simpson, el consorcio M14 presentó una baja diversidad (1.340 y 0.401 respectivamente), mientras que los consorcios M1B, M2, M5 y M22B presentaron una diversidad normal-alta (2.878 y 0.904,

2.447 y 0.838, 2.706 y 0.854, 2.581 y 0.820). A pesar de que el índice de Simpson está fuertemente ponderado hacia las especies más abundantes y el índice de Shannon otorga más peso por individuo a las especies raras que a las comunes, ambos valores confirmaron la diversidad relativamente alta de la mayoría de los consorcios comparada con otros estudios (Miura et al., 2007; Silva et al., 2010; Stamper, Walch, & Jacobs, 2003). Además, es importante mencionar que en la mayoría de los consorcios a excepción de M14, los valores del índice de Simpson cercanos a 1 demuestran una distribución más uniforme de las familias de microalgas presentes en cada consorcio. Sin embargo, hasta ahora es difícil entender como la diversidad microbiana afecta al rendimiento en general de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, ya que la diversidad y el rendimiento no están necesariamente asociados (Ibarbalz, Figuerola, & Erijman, 2013). De hecho, estudios mencionan que la dominancia de unas pocas especies puede resultar ser más ventajoso que una gran riqueza de especies ya que se busca generalmente obtener altas cantidades de biomasa que permitan reducir los nutrientes del agua residual (Sardi Saavedra et al., 2016).

Con respecto a las microalgas más abundantes, se observó que en ciertos consorcios (M2, M14A y M5), el filo más dominante de microalgas fue *Cyanobacteria*, mientras que en los consorcios M1B y M22B fue *Chlorophyta*. Ambas divisiones han sido extensamente reportadas en la literatura del tratamiento de aguas residuales (Barrera Bernal, Vázquez, Barceló Quintal, & Laure Bussy, 2008; Barthel, De Oliveira, & Da Costa, 2008; Shanthala, Hosmani, & Hosetti, 2009). Sin embargo, las cianobacterias poseen ciertas ventajas con respecto a las microalgas eucariotas dentro de las cuales se encuentra el filo *Chlorophyta*, que se cree las hacen más eficientes en la asimilación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales. De igual manera, se conoce que las microalgas pertenecientes al filo *Cyanobacteria* son eficaces eliminando nitrógeno en forma de amonio. El orden de utilización de las fuentes de N

por las cianobacterias es $\text{NH}_4^+ > \text{NO}_3^- > \text{N}_2$, y cuando el NH_4^+ está disponible no utilizan otra fuente hasta que el NH_4^+ se haya agotado. Además, las cianobacterias pueden almacenar N en forma de gránulos de cianoficina, un copolímero de arginina y ácido aspártico, dentro de la célula (Renuka et al., 2013; Stanier, 1996). Por otra parte, las cianobacterias también pueden almacenar el exceso de P en forma de gránulos de polifosfato (reserva intracelular de fofato) (Markou & Georgakakis, 2011). No obstante, las microalgas *Chlorophytas* también son capaces de captar grandes cantidades de nitrógeno y fósforo, incorporándolos en sus componentes celulares (Shcherbakov et al., 2016). Además, debido a su gran contenido de lípidos comparado con las cianobacterias, las microalgas eucariotas han sido el foco de atención para la producción de biodiesel a partir de la biomasa obtenida luego de los procesos de tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto, resulta difícil determinar qué grupo de microalgas presenta mayores ventajas en el tratamiento de aguas residuales y es por esto que, tanto microalgas eucariotas como cianobacterias han sido extensamente estudiadas en este campo. El nitrógeno y el fósforo son dos de los macronutrientes esenciales para ambos grupos de microalgas (procariotas y eucariotas). Por lo tanto, mediante su difusión a través de la pared celular de las microalgas se logra reducir la concentración de estos nutrientes en el agua residual. Incluso, debido al alto pH inducido por la fotosíntesis se puede observar otros fenómenos como la precipitación del fósforo y volatilización del amonio (Delgadillo-Mirquez, Lopes, Taidi, & Pareau, 2016).

El análisis metagenómico además proporcionó información acerca de las microalgas dominantes a nivel de género y reveló diferencias entre los 5 consorcios analizados. El consorcio M1B estuvo dominado por los géneros *Tetrademus*, *Monoraphidium* y *Geminocystis*; el consorcio M2 por *Pseudanabaena*; el consorcio M14A por *Leptolyngbya*; el consorcio M5 por *Synechococcus* y el consorcio M22B por *Chlorella*. Resulta interesante como

todos estos géneros han sido muy utilizados para el tratamiento de aguas residuales y de igual forma han sido identificados como los géneros dominantes en varios sistemas de tratamiento de aguas residuales (Barrera Bernal et al., 2008; Chindah, Braide, Amakiri, & Izundu, 2007; Martins, Peixe, & Vasconcelos, 2011; Vasconcelos & Pereira, 2001). Además de la eficiencia en la remoción de nutrientes, géneros como *Tetrademus*, *Monoraphidium* y *Chlorella* han resultado ser también eficientes en la remoción de compuestos farmacéuticos presentes en el agua residual (Escapa, Coimbra, Paniagua, García, & Otero, 2017). Asimismo, *Leptolyngbya* ha resultado ser un género potencial para el tratamiento de efluentes industriales que contienen nitrato, fosfato, fenol, sulfato y cianuro (Guha Thakurta, Aakula, Chakrabarty, & Dutta, 2018). Por lo tanto, es evidente el potencial de estos consorcios de microalgas para el tratamiento de aguas residuales.

Además de la composición de microalgas, los análisis metagenómicos permitieron analizar la composición de la comunidad bacteriana presente en estos consorcios. La dependencia de microalgas con la comunidad bacteriana asociada ha sido reconocida como un mecanismo único de reciclaje de nutrientes y regulación de crecimiento (Shin et al., 2018). Varios estudios han demostrado que las microalgas dependen de la comunidad bacteriana asociada para la absorción de nutrientes como el nitrógeno, hierro, azufre, y vitamina B12 (Buchan, LeCleir, Gulvik, & González, 2014). Así como se mencionó anteriormente, estos microorganismos forman una simbiosis en la que ambos se benefician entre sí, mejorando a su vez las tasas de crecimiento y absorción de nutrientes presentes en las aguas residuales. Se identificó entonces que las bacterias más abundantes en todos los consorcios pertenecieron al filo *Proteobacteria* (promedio 54.00%), seguido de *Cyanobacteria* (11.86%) y *Bacteroidetes* (9.8%). La proteobacterias y bacteroidetes son dos de los grupos conocidos por interactuar con macro y microalgas (Krustok, 2016). De hecho, se ha identificado que las bacterias

pertenecientes a estos dos grupos promueven el crecimiento e inducen la morfogénesis de las algas (Matsuo, 2005). Uno de los hallazgos importantes de esta investigación es la composición bacteriana encontrada que se asemeja mucho a los resultados de diversos estudios acerca de la comunidad bacteriana presente en plantas de tratamiento de aguas residuales. En general, los análisis de lodos activados realizados en plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas, municipales e incluso industriales comparten un perfil característico en niveles altos de organización taxonómica. Este perfil característico indica que las comunidades bacterianas están dominadas por el filo *Proteobacteria* seguido por *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacterias* y *Firmicutes* (Eschenhagen, Schuppler, & Röske, 2003; Ibarbalz et al., 2013; Tandoi et al., 2018; Wang, Hu, Xia, Wen, & Ding, 2012; Yang et al., 2011); resultados que concuerdan con el perfil característico de la presente investigación. Debido al enfoque en microalgas (cianobacterias y microalgas eucariotas) de este estudio, el porcentaje de *Cyanobacteria* es elevado, pues el medio de cultivo de donde se tomaron las muestras representa un medio de cultivo minimal estándar para microalgas (BG-11 modificado) que favorecería su crecimiento. Además, al igual que en el presente estudio, Hu et al. (2012), en un estudio de la estructura de la comunidad bacteriana de diferentes muestras de sistemas de tratamiento de aguas residuales, determinaron que dentro de las *Proteobacterias*, las clases más representadas fueron α -*Proteobacteria*, seguido de β -*Proteobacteria* y γ -*Proteobacteria*. No obstante, en ciertos consorcios (M1B, M14A, M5), la proporción de γ -*Proteobacteria* fue mayor que β -*Proteobacteria*. Aun así, los porcentajes obtenidos en todos los estudios anteriormente mencionados son muy similares a los porcentajes de lo que se obtuvo con los 5 consorcios Amazónicos analizados. Esta similitud resulta muy importante en cuanto al potencial de estos consorcios para el tratamiento de aguas residuales, pues las eficiencias de remoción de materia orgánica y nutrientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales mencionadas son bastante altas. No obstante, resulta difícil explicar este parecido entre los

consorcios analizados y las muestras tomadas de plantas de tratamiento de aguas residuales a nivel mundial. Una posible explicación podría ser que los cuerpos de agua de donde fueron tomados los consorcios microbianos, de alguna forma hayan estado influenciados por procesos de contaminación con aguas residuales. Si esta hipótesis es correcta, es evidente el potencial de estos consorcios para el tratamiento de aguas residuales ya que los microorganismos estarían acostumbrados a un ambiente con este tipo de contaminación. Es aquí en donde toma importancia el hecho de que estos consorcios sean nativos. Como se mencionó anteriormente, los consorcios nativos tienen mayor capacidad para crecer en ambientes con alto contenido de nutrientes y muestran tasas de crecimiento mayores que microorganismos que han sido introducidos y tienden a agregarse y exhibir auto-sedimentación, lo que facilita a su vez los procesos dentro de los sistemas de plantas de tratamiento de aguas residuales (Renuka et al., 2013; Zhou et al., 2012).

El análisis de la comunidad bacteriana a nivel de género también demostró diferencias entre consorcios ya que los géneros de bacterias dominantes (que representan más del 2% del total de reads clasificadas) fueron distintos en cada consorcio. No obstante, cabe destacar que la mayoría de estos géneros predominantes resultan muy atractivos para procesos de biorremediación. Por ejemplo, el género *Hypomicrobium*, identificado en el consorcio M1B, ha sido caracterizado por su función de nitrificación/desnitrificación en plantas de tratamiento de aguas residuales (Ju, Xia, Guo, Wang, & Zhang, 2014; Zhu et al., 2018). Por otra parte, *Phenylobacterium* (M2), *Arenimonas* (M14A), *Sphingophyxis* (M22B y M5) y *Roseomonas* (M22B) tienen una alta capacidad de degradación de compuestos xenobióticos, drogas, hidrocarburos y pesticidas organofosforados (respectivamente) (Chu et al., 2015; Cydzik-Kwiatkowska & Zielińska, 2018; Ju et al., 2014; Zuoshen, Jun, Mingchao, Xin, & Anhuai, 2009). Además, la alta abundancia de *Sphingophyxis* en el consorcio M22B (13%) y su

capacidad de degradar hidrocarburos mencionada en la literatura, podría estar relacionada con procesos de contaminación del cuerpo de agua de donde fue tomada esta muestra. Pues se sabe que la mayor parte de los ríos de Lago Agrio se encuentran contaminados con hidrocarburos, producto de las actividades hidrocarbúferas que se llevan a cabo en la zona (El Universo, 2016).

Tomando todo en consideración, resulta difícil determinar qué consorcio es más eficiente en base a las microalgas y comunidad bacteriana presente en cada uno. Al considerar el porcentaje de remoción de $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ y DQO obtenido en un estudio de biorremediación paralelo realizado con estos consorcios, las diferencias no resultan ser tan claras como para atribuir a las diferencias de diversidad de microalgas y/o comunidad bacteriana de cada consorcio encontrada en la presente investigación (Anexo 8). Aun así, en general, todos los consorcios mostraron porcentajes de remoción de materia orgánica y nutrientes elevados, confirmando de esta forma la eficiencia de estos consorcios nativos Amazónicos en el tratamiento de aguas residuales. Debido a esto y tomando en cuenta que los consorcios presentan uniformidad a niveles taxonómicos altos, el enfoque para determinar si un consorcio es mejor que otro debería realizarse en base a otras características como por ejemplo la cantidad de biomasa obtenida luego del tratamiento de aguas residuales, las tasas de crecimiento, la facilidad de cultivo de los consorcios en agua residual real, el tiempo promedio de remoción de materia orgánica y nutrientes, etc. No obstante, estudios de este tipo acerca de la microbiología de consorcios nativos con potencial de biorremediación de aguas residuales, en un futuro permitirá crear consorcios con capacidades específicas de tratamiento deseadas y buena obtención de biomasa para su posterior aprovechamiento como productos secundarios derivados.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de métodos tradicionales dependientes de cultivo fueron diferentes a los resultados obtenidos a partir de los análisis metagenómicos. A pesar de que los métodos tradicionales no dejan de ser importantes, la superioridad de los métodos actuales basados en secuenciación de última generación es evidente y su gran alcance es de mucha importancia en estudios de este tipo. En base al análisis metagenómico, se determinó una diversidad de microalgas normal-alta para los consorcios M1B ($H'=2.878$, $D=0.904$), M2 ($H'=2.447$, $D=0.838$), M5 ($H'=2.706$, $D=0.854$) y M22B ($H'=2.851$, $D=0.820$); mientras que el consorcio M14A presentó una diversidad baja ($H'=1.340$, $D=0.401$). A pesar de que la mayoría de los consorcios presentó una diversidad normal-alta, a nivel de géneros más abundantes de microalgas, la diferencia entre consorcios es indiscutible. Pues todos los consorcios analizados estuvieron dominados por distintos géneros de microalgas. Sin embargo, resulta difícil relacionar estas diferencias con la capacidad biorremediadora de cada uno de los consorcios.

En cuanto a la estructura de la comunidad bacteriana, el perfil de estos consorcios a niveles taxonómicos altos fue muy similar y coincide con estudios realizados en distintas plantas de tratamiento a nivel mundial. Este resultado resulta prometedor y tomando en cuenta además su característica nativa, se espera que estos consorcios tengan una alta efectividad como posibles tratamientos secundarios y terciarios para el tratamiento de aguas residuales en el Ecuador.

10. RECOMENDACIONES

A pesar de que estudios futuros podrán beneficiarse de esta investigación, es importante tomar en cuenta que el presente análisis se realizó sobre la comunidad de microalgas y bacterias en un medio de cultivo minimal para microalgas (BG-11 modificado) con el fin de evitar interferencias de microorganismos que pueden estar presentes en el agua residual. Por lo tanto, ya con esta base, se recomienda realizar estudios acerca de la comunidad de microalgas y bacterias de estos consorcios en reactores a escala de laboratorio con agua residual real y posteriormente incluso realizarla en reactores de flujo continuo a mayor escala. A medida que las aguas residuales fluyan constantemente a través del reactor, las comunidades microbianas evidentemente serán diferentes y resulta entonces importante evaluar estas diferencias a través del tiempo. Además, para las técnicas dependientes de cultivo, se recomienda contar con herramientas que permitan una mejor identificación de microalgas a niveles taxonómicos bajos como género y especie.

Con el fin de obtener una comprensión más amplia acerca de la microbiología de consorcios nativos con potencial de biorremediación, se recomienda además realizar estudios de la función de los genes presente en estos metagenomas. De seguro esto permitirá tener una idea acerca de los procesos que se están llevando a cabo y los microorganismos involucrados en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Aguilera, A., & Amils, R. (2005). Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic Toxicology*, 75(4), 316–329.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.002>
- Alcántara, C., Fernández, C., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2015). Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6125-5>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Aravindraja, C., Viszwapriya, D., & Karutha Pandian, S. (2013). Ultradeep 16S rRNA Sequencing Analysis of Geographically Similar but Diverse Unexplored Marine Samples Reveal Varied Bacterial Community Composition. *PLoS ONE*, 8(10), 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076724>
- Armijos, E., Carranza, F., Pitt, P., Niekerk, A. Van, Vidal, X., Gomez, L., ... Africa, G. A. (2011). Improving Quality of Life for the Residents of Quito through an Integrated Sustainable Water Recovery Project, 1–10. Retrieved from
[http://www.aidis.org.br/PDF/cwwa2015/CWWA_2015_Paper_Quito
Project_EfrainArmijos.pdf](http://www.aidis.org.br/PDF/cwwa2015/CWWA_2015_Paper_Quito_Project_EfrainArmijos.pdf)
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from

synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64–70.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>

Barrera Bernal, C., Vázquez, G., Barceló Quintal, I., & Laure Bussy, A. (2008). Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 190(1–4), 259–270.

<https://doi.org/10.1007/s11270-007-9598-3>

Barthel, L., De Oliveira, P. A. V., & Da Costa, R. H. R. (2008). Plankton biomass in secondary ponds treating piggery waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1287–1298. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000600025>

Benítez, M. B., Champagne, P., Ramos, A., Torres, A. F., & Ochoa-Herrera, V. (2018). Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae.

Environmental Technology (United Kingdom), 3330, 1–9.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1459874>

Brierley, B., Carvalho, L., Davies, S., & Krokowski, J. (2007). Guidance on the quantitative analysis of phytoplankton in Freshwater Samples Environment Agency (EA), Leeds Environment Agency (EA), Haddiscoe Scottish Environment Protection Agency (SEPA), East Kilbride, 1–24.

Braich, O. S., & Kaur, R. (2015). Phytoplankton Community Structure and Species Diversity of Nangal. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4(3), 76–83.

Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A., & González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(10), 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>

Ceballos, S. J., VanderGheynst, J. S., Higgins, B. T., Fitzgerald, P. S., Fiehn, O., & Gennity, I. (2018). Algal–bacterial synergy in treatment of winery wastewater. *Npj Clean Water*,

1(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0005-y>

- Chindah, A. C., Braide, S. A., Amakiri, J., & Izundu, E. (2007). Succession of phytoplankton in a municipal waste water treatment system under sunlight. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7(1), 258–273.
- Chu, C., Yuan, C., Liu, X., Yao, L., Zhu, J., He, J., ... Huang, X. (2015). *Phenylobacterium kunshanense* sp. Nov., isolated from the sludge of a pesticide manufacturing factory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 325–330. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.063644-0>
- Cooper, M. B., & Smith, A. G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*, 26(Figure 1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.003>
- Corvelo, A., Clarke, W. E., Robine, N., & Zody, M. C. (2018). taxMaps: Comprehensive and highly accurate taxonomic classification of short-read data in reasonable time. *Genome Research*, 28(5), 751–758. <https://doi.org/10.1101/gr.225276.117>
- Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2018). Microbial composition of biofilm treating wastewater rich in bisphenol A. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 53(4), 385–392. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1404326>
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W., & Pröschold, T. (2015). Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE*, 10(6), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127838>
- De Godos, I., González, C., Becares, E., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2009). Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1825-3>

- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports, 11*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>
- Donachie, S. P., Foster, J. S., & Brown, M. V. (2007). Culture clash: Challenging the dogma of microbial diversity. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.22>
- El Universo. (2016). En Sucumbíos, elevados niveles de hidrocarburos y coliformes en agua. Retrieved from <https://www.eluniverso.com/noticias/2013/05/25/nota/955126/sucumbios-elevados-niveles-hidrocarburos-coliformes-agua>
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2017). Comparison of the culture and harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus* for the removal of pharmaceuticals from water. *Journal of Applied Phycology, 29*(3), 1179–1193. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1010-5>
- Eschenhagen, M., Schuppler, M., & Röske, I. (2003). Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research, 37*(13), 3224–3232. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00136-2)
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics, 32*(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fistarol, G. O., Hargreaves, P. I., Walter, J. M., Viana, T. V., Gomes, P. D. F., Lourenço, C. B., ... Salomon, P. S. (2018). Rapid isolation of culturable microalgae from a tropical shallow lake system. *Journal of Applied Phycology, 30*(3), 1807–1819. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1404-7>

- Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., & López-Rodas, V. (2005). Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist*, *166*(2), 655–661. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01325.x>
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, *24*, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00029-1)
- Guamán, M., & Gonzáles, N. (2016). *Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador*. (L. R. de Guillén, Ed.). Quito: Corporación para la investigación energética laboratorio de biotecnología energética.
- Guha Thakurta, S., Aakula, M., Chakrabarty, J., & Dutta, S. (2018). Bioremediation of phenol from synthetic and real wastewater using *Leptolyngbya* sp.: a comparison and assessment of lipid production. *3 Biotech*, *8*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1229-8>
- Guo, C. H., Stabnikov, V., & Ivanov, V. (2010). The removal of nitrogen and phosphorus from reject water of municipal wastewater treatment plant using ferric and nitrate bioreductions. *Bioresource Technology*, *101*(11), 3992–3999. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.039>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2013). Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae-bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresource Technology*.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.029>

Hu, M., Wang, X., Wen, X., & Xia, Y. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, *117*, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.061>

Ibarbalz, F. M., Figuerola, E. L. M., & Erijman, L. (2013). Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water Research*, *47*(11), 3854–3864. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.010>

Jones, K. J. (2018). Bioinformatic analysis of biotechnologically important microbial communities, (April).

Ju, F., Xia, Y., Guo, F., Wang, Z., & Zhang, T. (2014). Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology*, *16*(8), 2421–2432. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12355>

Krustok, I. (2016). Microbiological analysis of municipal wastewater treating photobioreactors Mälardalens Högskola Microbiological analysis of municipal wastewater treating photobioreactors Ivo Krustok Supervisors : Monica Odlare (PhD) Jaak Truu (PhD), (January).

Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review Avloppsrening med mikroalger – en litteraturstudie Algal growth. *Environmental Microbiology*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.10.029>

Luna, M. (2014). *Estudio del tratamiento de aireación prolongada para aguas residuales utilizando como matriz agua de mar*. Retrieved from [https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/216/1/Estudio de tratamiento de aireación prolongada para aguas residuales utilizando como matriz agua de mar_rees.pdf](https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/216/1/Estudio%20de%20tratamiento%20de%20aireaci3n%20prolongada%20para%20aguas%20residuales%20utilizando%20como%20matriz%20agua%20de%20mar_rees.pdf)

- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Martins, J., Peixe, L., & Vasconcelos, V. M. (2011). Unraveling Cyanobacteria Ecology in Wastewater Treatment Plants (WWTP). *Microbial Ecology*, 62(2), 241–256. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9806-y>
- Matsuo, Y. et al. (2005). Isolation of an Algal Morphogenesis. *Science*, 307(March), 1598. <https://doi.org/10.1126/science.1105486>
- Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Miura, Y., Hiraiwa, M. N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2007). Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Research*, 41(3), 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.005>
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Quilumbaqui, C. (2017). *Determinación de la concentración de elementos mayores en dieciocho ríos de la provincia de Pichincha, Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>

- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2014). Influence of seasonal variation in water quality on the microalgal diversity of sewage wastewater. *South African Journal of Botany*, *90*, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.10.017>
- Renuka, N., Sood, A., Ratha, S. K., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2013). Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, *25*(5), 1529–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9982-x>
- Sardi Saavedra, A., Pena Salamanca, E. J., Madera Parra, C. A., & Ceron Hernandez, V. A. (2016). Diversidad de las comunidades de algas asociadas a un sistema algal de alta tasa fotosintetica para la biorremediacion de lixiviados de rellenos sanitarios. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *44*(1), 113–120. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-11>
- Shanthala, M., Hosmani, S. P., & Hosetti, B. B. (2009). Diversity of phytoplanktons in a waste stabilization pond at Shimoga Town, Karnataka State, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, *151*(1–4), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0287-5>
- Shcherbakov, P. N., Dolnikova, G. A., Semenova, L. R., Lobakova, E. S., Selyakh, I. O., Chivkunova, O. B., ... Chekanov, K. A. (2016). Assessment of a New *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta) Ippas C-2015 Strain for Application in Poultry Wastewater Bioremediation. *Biotekhnologiya*, (2), 72–81. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2016-2-72-81>
- Shin, H., Lee, E., Shin, J., Ko, S. R., Oh, H. S., Ahn, C. Y., ... Cho, S. (2018). Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae *Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing. *Scientific Reports*, *8*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23634-6>

- Silva, C. C., Jesus, E. C., Torres, A. P. R., Sousa, M. P., Santiago, V. M. J., & Oliveira, V. M. (2010). Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 447–449.
<https://doi.org/10.4014/jmb.0906.06052>
- Sonune, A., & Ghate, R. (2004). Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*, 167(1–3), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.06.113>
- Stamper, D. M., Walch, M., & Jacobs, R. N. (2003). Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 852–860. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.852-860.2003>
- Stanier, R. Y. (1996). *Microbiology*. (Reverté, Ed.). Barcelona.
- Stanier, R. Y., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29(6), 896–907.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
- Tandoi, V., Levantesi, C., Eikelboom, D., van der Waarde, J., Snaidr, J., Rossetti, S., ... Lemaitre, M. (2018). Phylogenetic analysis and in situ identification of “Nostocoida limicola”-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 46(1–2), 99–104.
<https://doi.org/10.2166/wst.2002.0462>
- Taubeneck, U. (2007). H. W. Seeley, Jr. and P. J. Van Denmark. *Microbes in Action A*

- Laboratory Manual (2nd Edition). XII und 361 S., zahlr. Abb. San Francisco 1972: W. H. Freeman & Co. \$ 5.50. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*.
<https://doi.org/10.1002/jobm.3630130835>
- Tumlin, S., & Mattsson, A. (2013). Influent loads – observed trends at large wastewater treatment plants in Sweden. *Nord-IWA, Malmö, October 8-10 2013*.
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>
- Vasconcelos, V. M., & Pereira, E. (2001). Cyanobacteria diversity and toxicity in a Wastewater Treatment Plant (Portugal). *Water Research*, 35(5), 1354–1357.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00512-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00512-1)
- Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2011). Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: A case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(2), 245–257. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9583-0>
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., & Ding, K. (2012). Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in china. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7042–7047. <https://doi.org/10.1128/AEM.01617-12>
- Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Li, Q., Li, B., Wang, S., ... Mulchandani, A. (2011). Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, 45(17), 7408–7415. <https://doi.org/10.1021/es2010545>
- Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., & Cheng, Y. (2012). A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*, 110, 446–455.

- Zhu, H., Xu, X. yang, Yu, Q., Yan, G., Zhu, L., & Zhang, B. (2018). Seasonal bacterial community succession in four typical wastewater treatment plants: correlations between core microbes and process performance. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22683-1>
- Zimmer, E. A., & Roalson, E. H. (2005). Methods in Enzymology: Preface. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95043-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95043-X)
- Zuoshen, Z., Jun, L., Mingchao, M., Xin, J., & Anhuai, L. (2009). Bacterial Diversity of Active Sludge in Wastewater Treatment Plant. *Earth Science Frontiers*, 15(6), 163–168.
[https://doi.org/10.1016/s1872-5791\(09\)60015-4](https://doi.org/10.1016/s1872-5791(09)60015-4)

TABLAS

Tabla 1 Resultados del conteo de morfotipos (UFC) de microalgas encontrados mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo.

| Morfotipo | M1B (UFC/ml) | M2 (UFC/ml) | M14A (UFC/ml) | M5 (UFC/ml) | M22B (UFC/ml) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| <i>Chlorophyta</i> | 293,000 (±14731) | 54,333 (±3756) | 7,633,333 (±638575) | 2,666,667 (±405518) | 116,333 (±19029) |
| <i>Pseudanabaena (I)</i> | 40,033 (±3526) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cyanobacteria</i> | 0 | 0 | 7,000 (±577) | 0 | 0 |
| <i>Pseudanabanaceae</i> | 0 | 0 | 100 (±0) | 0 | 0 |
| <i>Leptolyngbya (I)</i> | 0 | 2,333 (±667) | 0 | 14,533 (±811) | 0 |
| <i>Synechococcales</i> | 0 | 35,000 (±1528) | 0 | 0 | 0 |
| <i>Synechocystis sp.</i> | 0 | 148,000 (±12601) | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pseudanabaena (II)</i> | 0 | 0 | 7,233 (±448) | 0 | 0 |
| <i>Pseudanabaena (III)</i> | 0 | 0 | 0 | 43,333 (±8819) | 0 |
| <i>Leptolyngbya (II)</i> | 0 | 0 | 0 | 46,667 (±6667) | 0 |
| <i>Leptolyngbyaceae</i> | 0 | 0 | 0 | 23,333 (±6667) | 0 |
| <i>Pseudanabaena (IV)</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 667 (±333) |
| Total | 333,033 | 239,667 | 7,647,667 | 2,794,533 | 117,000 |

Tabla 2 Índices de diversidad de familias de microalgas determinados a partir de los resultados de técnicas tradicionales dependientes de cultivo.

| Índice | M1B | M2 | M14A | M5 | M22B |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Shannon (H') | 0.367 | 0.960 | 0.015 | 0.215 | 0.035 |
| Simpson (D) | 0.212 | 0.546 | 0.004 | 0.088 | 0.011 |

Tabla 3 Índices de diversidad de familias de microalgas determinados a partir de análisis metagenómicos.

| Índice | M1B | M2 | M14A | M5 | M22B |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Riqueza familias | 102 | 89 | 118 | 73 | 100 |
| Shannon (H') | 2.878 | 2.446 | 1.340 | 2.706 | 2.581 |
| Simpson (D) | 0.904 | 0.838 | 0.401 | 0.854 | 0.820 |

Tabla 4 Porcentaje de microorganismos importantes en cada consorcio.

| | M1B (%) | M2 (%) | M14A (%) | M5 (%) | M22B (%) |
|-------------------------|---------|--------|----------|--------|----------|
| UNCLASSIFIED | 59 | 43 | 51 | 68 | 33 |
| CLASSIFIED | 41 | 57 | 49 | 32 | 67 |
| VIRUSES | 0.06 | 0.03 | 0.06 | 0.09 | 0.01 |
| ARCHAEA | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.09 |
| BACTERIA | 90 | 97 | 93 | 94 | 97 |
| <i>Proteobacteria</i> | 58 | 60 | 42 | 46 | 64 |
| <i>α-Proteobacteria</i> | 49 | 63 | 54 | 44 | 61 |
| <i>β-Proteobacteria</i> | 18 | 15 | 6 | 19 | 23 |
| <i>γ-Proteobacteria</i> | 25 | 12 | 30 | 27 | 13 |
| <i>Actinobacteria</i> | 7 | 3 | 4 | 5 | 2 |
| <i>Chloroflexi</i> | 1 | 1 | 3 | 3 | 0.2 |
| <i>Firmicutes</i> | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| <i>Acidobacteria</i> | 3 | 2 | 2 | 13 | 1 |
| <i>Bacteroidetes</i> | 7 | 2 | 7 | 9 | 24 |
| <i>Planctomycetes</i> | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 |
| <i>Gemmatimonadetes</i> | 3 | 4 | 0.3 | 1 | 0.3 |
| <i>Cyanobacteria</i> | 4 | 17 | 31 | 7 | 0.3 |
| EUKARYOTA | 10 | 2 | 6 | 5 | 3 |
| <i>Chlorophyta</i> | 59 | 46 | 47 | 57 | 59 |
| <i>Opisthokonta</i> | 18 | 28 | 34 | 21 | 16 |

Nota: El porcentaje de "VIRUSES", "ARCHAEA", "BACTERIA" y "EUKARYOTA" se representa en términos del total de lecturas clasificadas. El porcentaje de los filos dentro de "BACTERIA" se representa en términos del total de bacterias clasificadas. El porcentaje de clases dentro de "Proteobacteria" se representa en términos del total de Proteobacterias clasificadas.

FIGURAS

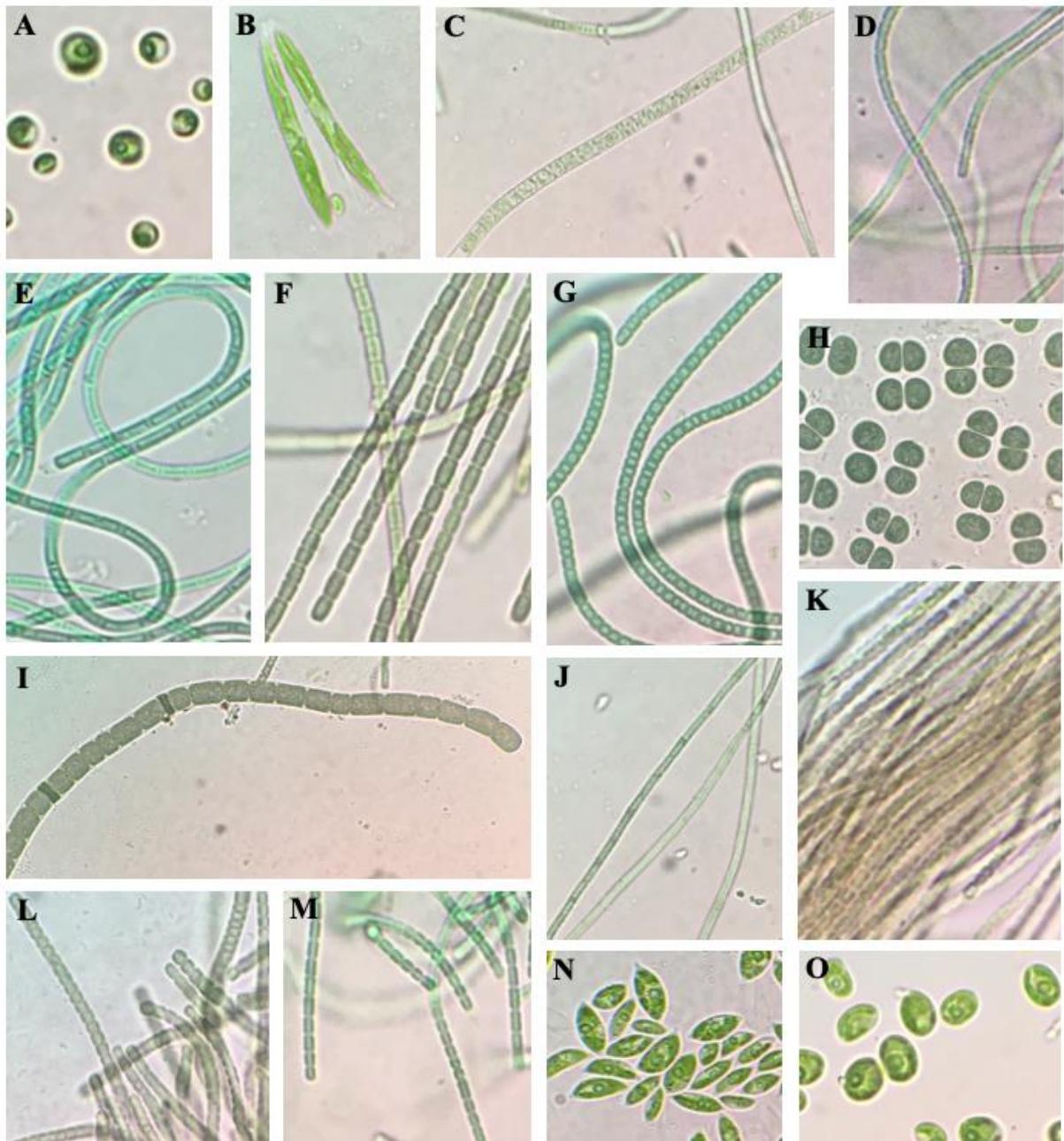


Figura 1 Micrografías de los posibles morfotipos identificados durante el cultivo de microalgas. (A, B, N y O) *Unclassified Chlorophyta* [M1B, M2, M14A, M5, M22B]; (C) *Leptolyngbyaceae* [M5]; (D) *Pseudanabaena sp.* [M1B]; (E) *Unclassified Cyanobacteria* [M14A]; (F) *Pseudanabanaceae* [M14A]; (G) *Leptolyngbya sp.* [M2, M5]; (H) *Synechocystis* [M2]; (I) *Unclassified Synechococcales* [M2]; (J) *Pseudanabaena sp.* [M14A]; (K) *Pseudanabaena sp.* [M5]; (L) *Leptolyngbya sp.* [M5]; (M) *Pseudanabaena sp.* [M22B]. Fotografías por LIA-USFQ.

Figura 3 Composición de microalgas más abundantes de los consorcios. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de microalgas con reads clasificadas >2% del total de microalgas.

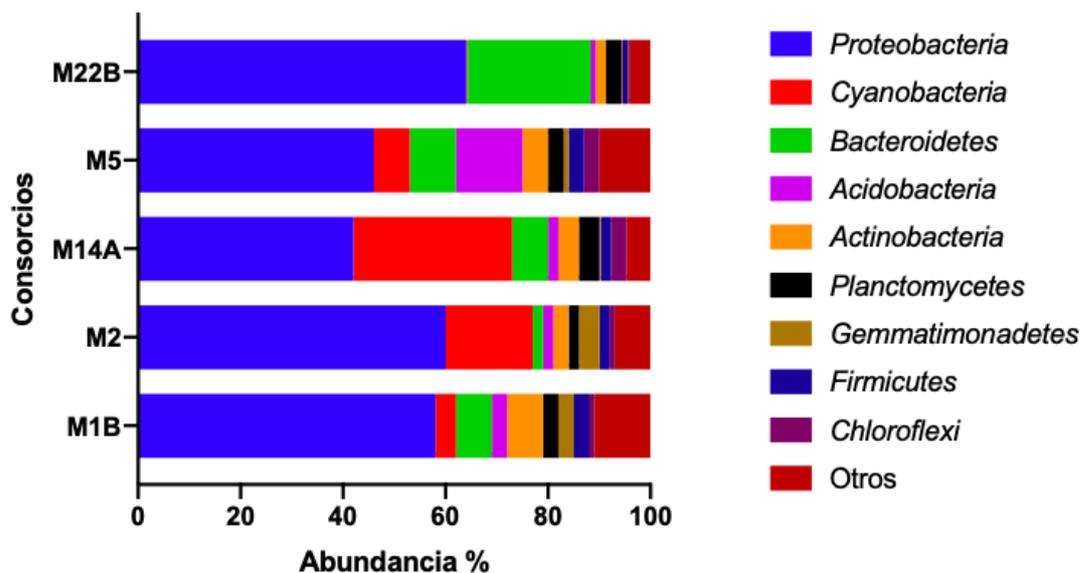


Figura 4 Composición de los principales filos de bacterias de cada consorcio. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de bacterias clasificadas. "Otros" se refiere a taxones con abundancia promedio <1.5%.

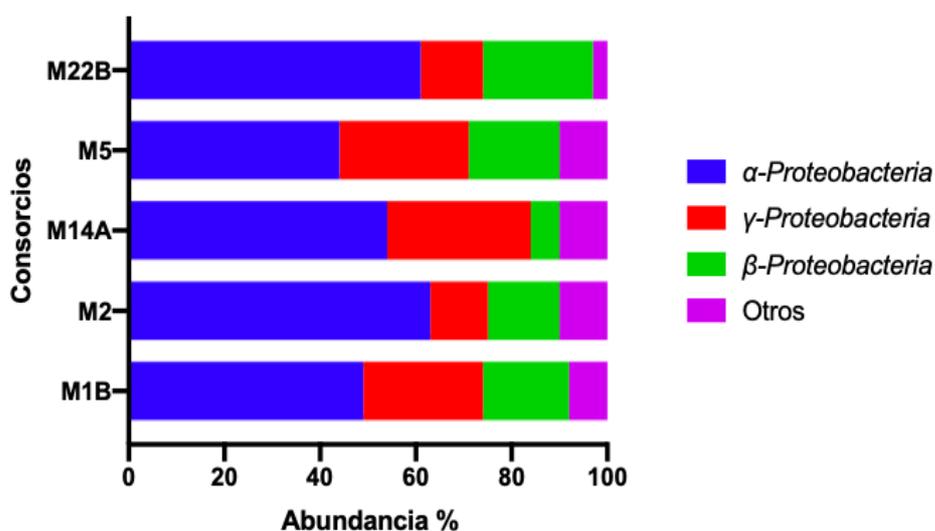
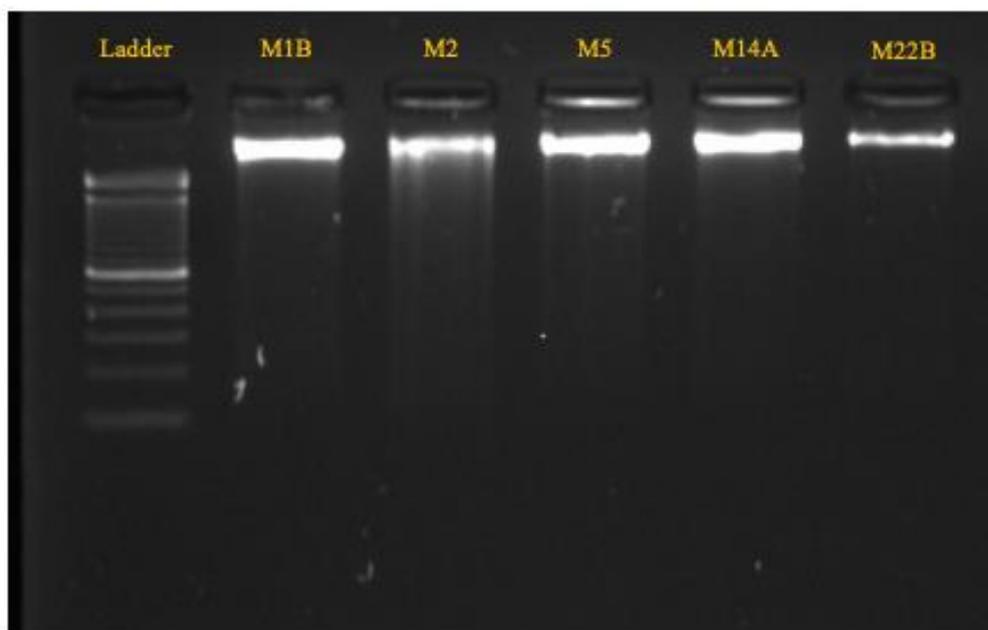


Figura 5 Composición de clases de Proteobacteria en cada consorcio. La abundancia se representa en términos de porcentaje del total de Proteobacterias. "Otros" se refiere a clases con abundancia promedio menor a 10%.

ANEXOS

Anexo 1 *Concentración y pureza del ADN extraído de los consorcios.*

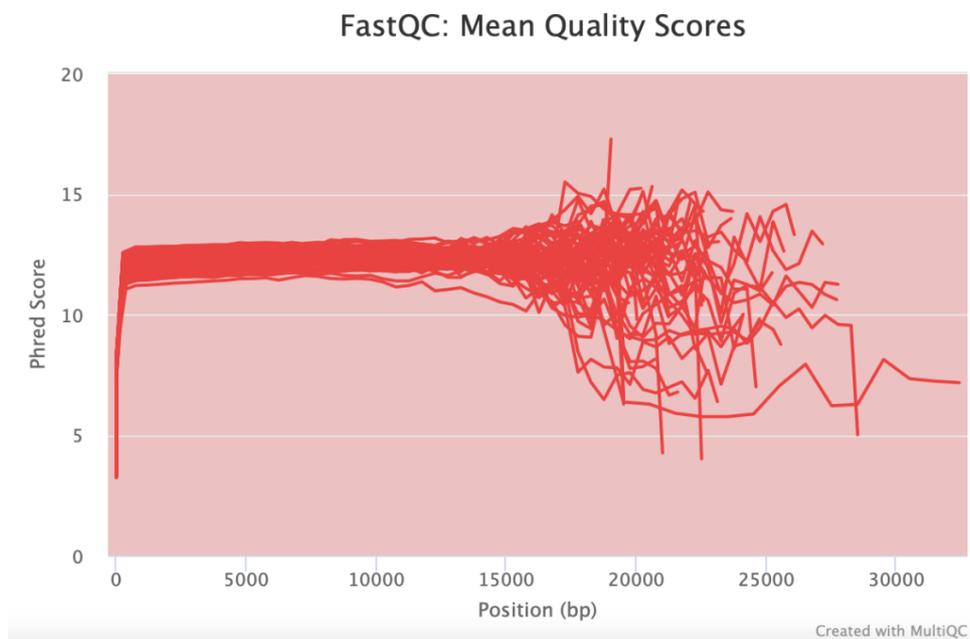
| # | Sample ID | Date and Time | Nucleic Acid Conc. | Unit | 260/280 | 260/230 |
|---|-----------|---------------------|--------------------|-------|---------|---------|
| 1 | M1B | 20/03/2018 11:16:34 | 127 | ng/μl | 1,88 | 1,89 |
| 2 | M2 | 20/03/2018 11:17:25 | 78,2 | ng/μl | 1,87 | 2 |
| 3 | M5 | 20/03/2018 11:18:10 | 118,2 | ng/μl | 1,85 | 1,87 |
| 4 | M14A | 20/03/2018 11:18:59 | 82,7 | ng/μl | 1,89 | 1,84 |
| 5 | M22B | 20/03/2018 11:19:55 | 45,7 | ng/μl | 1,91 | 1,77 |



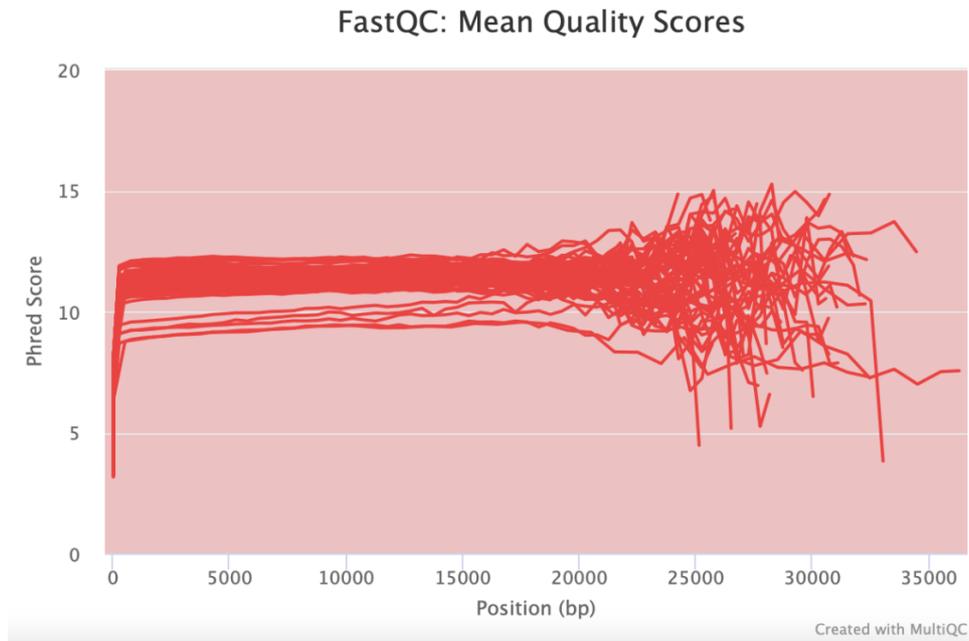
Anexo 2 *Electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar la presencia del ADN extraído de los 5 consorcios. Ladder 100 pb (Invitrogen).*



Anexo 3 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M1B analizado con el software MultiQC.



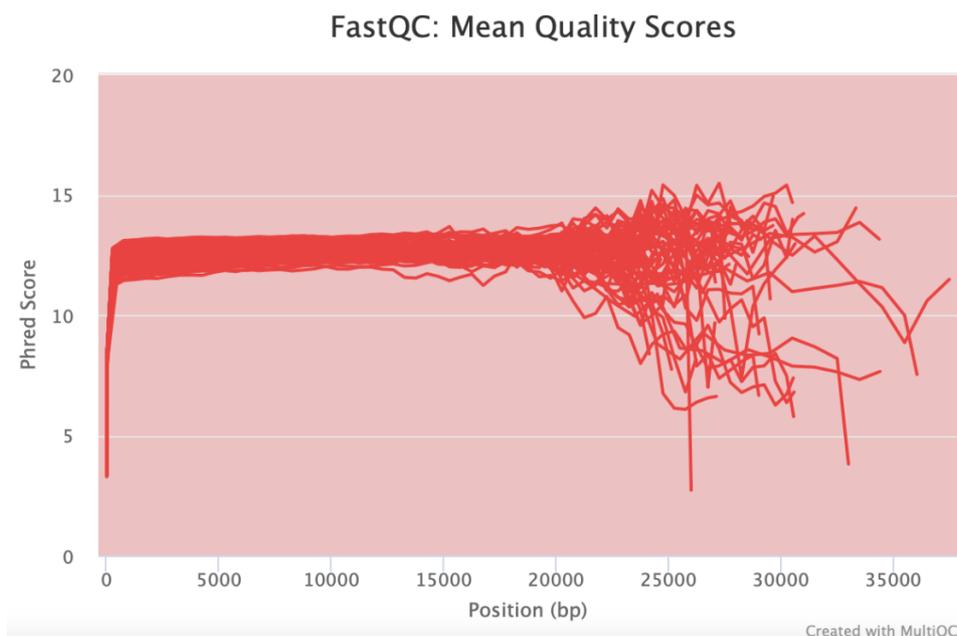
Anexo 4 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M2 analizado con el software MultiQC.



Anexo 5 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M14A analizado con el software MultiQC.



Anexo 6 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M5 analizado con el software MultiQC.



Anexo 7 Phred quality score de las lecturas de secuencia del consorcio M22B analizado con el software MultiQC.

Anexo 8 Porcentajes de remoción de $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ y DQO obtenidos a partir de los ensayos de biorremediación de los consorcios microbianos en agua residual estéril. (Fuente: LIA-USFQ)

| Consortio | $\text{NH}_4\text{-N}$ | $\text{PO}_4\text{-P}$ | DQO |
|------------------|--|--|--------------------|
| M1B | 71.589 ± 1.160 | 77.850 ± 3.674 | 84.056 ± 2.312 |
| M2 | 60.159 ± 2.977 | 81.818 ± 0.456 | 91.012 ± 1.431 |
| M5 | 57.777 ± 2.663 | 85.180 ± 1.277 | 92.320 ± 1.112 |
| M14A | 58.250 ± 9.897 | 100.000 ± 0 | 91.466 ± 2.674 |
| M22B | 57.777 ± 2.663 | 89.683 ± 2.205 | 92.320 ± 1.112 |