

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Análisis y comparación de metagenomas de consorcios  
microbianos de Galápagos con capacidad de remediación de  
aguas residuales**

**María José Ordóñez Suárez**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 4 de mayo de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Análisis y comparación de metagenomas de consorcios microbianos de  
Galápagos con capacidad de remediación de aguas residuales**

**María José Ordóñez Suárez**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Andrés Torres, PhD**

Quito, 4 de mayo de 2020

## **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.

Nombres y apellidos: María José Ordóñez Suárez

Código: 00131781

Cédula de identidad: 1722077938

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La caracterización de consorcios microalga-bacteria nativos ayuda al tratamiento de aguas residuales que actualmente se descargan en ríos y océanos contaminándolos. Dentro de la biodiversidad probablemente existen microorganismos que se pueden aprovechar para incrementar la efectividad de remediación, lo que genera una oportunidad de estudio en lugares como Galápagos cuya diversidad microbiana es poco conocida. Actualmente se cuenta con las herramientas necesarias como la metagenómica, que permite obtener información de microorganismos no cultivables y la secuenciación por nanoporo (MinION). Ambas posibilitan explorar la diversidad y riqueza de consorcios nativos con interés en biorremediación. En el presente estudio se caracterizaron seis consorcios nativos de Galápagos propagados en agua residual estéril. Para ello se realizaron tres ensayos de secuenciamiento con el MinION. Luego con análisis bioinformáticos y metagenómicos se calculó la alfa y beta diversidad; además de la composición taxonómica. Como resultado, en base a los índices de Shannon y Pielou se obtuvo una alfa diversidad alta en los consorcios G2 ( $H' = 2,07$ ,  $J' = 0,58$ ), G4 ( $H' = 2,24$ ,  $J' = 0,64$ ) y G5 ( $H' = 1,96$ ,  $J' = 0,61$ ). Con respecto a la beta diversidad se obtuvieron valores altos del índice de Bray Curtis (entre 0,77 y 0,99). Se sugiere que el índice está sobreestimado debido a los altos valores obtenidos entre los mismos consorcios en los diferentes ensayos de secuenciamiento. Es posible que la baja cobertura y la alta tasa de error del MinION provocaran la sobreestimación del índice. En base al perfil taxonómico se encontró que los consorcios presentan una composición taxonómica única. Los principales filos encontrados son Proteobacteria, Terrabacteria, Chlorophyta y Bacteroidetes; todos de interés para el tratamiento de aguas residuales. Se demostró que existen diferencias entre consorcios a nivel de alfa y beta diversidad, esto podría ser atribuido a las características del medio del cual se tomaron las muestras. La composición taxonómica presenta filos de interés en biorremediación; por tanto estos consorcios nativos tienen gran potencial para el tratamiento de aguas residuales. Finalmente, el estudio provee nueva información genómica que contribuye a las bases de datos y a futuros estudios de biodiversidad en consorcios microbianos nativos.

**Palabras claves:** consorcio, microalga, biorremediación, Galápagos, secuenciamiento, MinION, alfa diversidad, beta diversidad, composición taxonómica

## ABSTRACT

The characterization of native microalgae-bacteria consortia will help wastewater treatment that is currently discharged into rivers and oceans contaminating them. Within the biodiversity there are probably microorganisms that can be used to increase the effectiveness of water remediation. This creates a research opportunity especially in places like Galapagos, whose microbial diversity is poorly understood. Currently, the necessary tools to study these consortia are available. Such as metagenomics, which allows obtaining information on non-cultivable microorganisms and nanopore sequencing (MinION). Both make it possible to explore the diversity and richness of native consortia with an interest in bioremediation. In this study three sequencing trials were performed with the MinION of six consortia from Galapagos, previously propagated in sterile wastewater. Then with bioinformatic and metagenomic analyzes, alpha and beta diversity index were calculated; besides the taxonomic composition. As a result, a high alpha diversity in consortia G2 ( $H' = 2.07$ ,  $J' = 0.58$ ), G4 ( $H' = 2.24$ ,  $J' = 0.64$ ) and G5 ( $H' = 1.96$ ,  $J' = 0.61$ ) was observed, based on the Shannon and Pielou index. According to the beta diversity, high values of the Bray Curtis index were obtained (between 0.77 and 0.99). It is suggested that the index is overestimated due to the high values between the same consortia in different sequencing trials. It is possible that the low coverage and the high error rate of the MinION caused the index to be overestimated. Moreover, based on the taxonomic profile it was found that all consortia present a unique taxonomic composition. The main phylum found were Proteobacteria, Terrabacteria, Chlorophyta and Bacteroidetes; all of interest for wastewater treatment. Thus, it was demonstrated that there were differences between consortia at the alpha and beta diversity levels. This could be caused due to the characteristics of the medium from which the samples were taken. The taxonomic composition presents interesting groups for bioremediation; therefore, these native consortia have great potential for wastewater treatment. Finally, the study provides new genomic information that contributes to databases and future biodiversity studies in native microbial consortia.

**Keywords:** consortium, microalgae, bioremediation, Galapagos, sequencing, MinION, alpha diversity, beta diversity, taxonomic composition

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	10
Métodos .....	16
Colección de muestras y propagación de los consorcios.....	16
Concentración de biomasa y extracción de adn.....	16
Purificación del adn.....	17
Cuantificación y visualización del adn.....	17
Secuenciación mediante oxford nanopore minion y basecalling.....	17
Análisis de calidad de secuencias crudas y demultiplexing .....	18
Alfa diversidad .....	18
Beta diversidad .....	19
Permanova .....	20
Asignación taxonómica .....	20
Resultados.....	21
Secuenciamiento y análisis de datos técnicos .....	21
Alfa diversidad .....	22
Beta diversidad .....	23
Asignación taxonómica .....	24
Discusión .....	26
Conclusiones.....	33
Referencias bibliográficas .....	34
Tablas .....	43
Figuras .....	46
Anexos.....	49
Anexo A: Metadata empleada para los análisis de alfa y beta diversidad.....	49
Anexo B: Ensayos de remoción con los consorcios microalga-bacteria de Galápagos .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Información obtenida de la secuenciación de consorcios microalga-bacteria .....	43
Tabla 2.- Total de lecturas clasificadas en cada consorcio.....	43
Tabla 3.- Cálculo de la alfa diversidad para los seis consorcios microalga-bacteria .....	44
Tabla 4.- Influencia de variables experimentales y ambientales en la alfa diversidad.....	44
Tabla 5.- Influencia de variables experimentales y ambientales en la beta diversidad.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Comparación de los principales filos en los seis consorcios de Galápagos.....	46
Figura 2.- Mapa de origen de los consorcios G1, G2, G3 y G4 en la Isla San Cristóbal .....	46
Figura 3.- Mapa de origen de los consorcios G5 y G6 en la Isla Isabela .....	47
Figura 4.- Krona charts de Bacteria en el Ensayo de Secuenciamiento 2 .....	47
Figura 5.- Krona charts de Eucariotas en el Ensayo de Secuenciamiento 2.....	48

## INTRODUCCIÓN

Según la CEPAL, la conservación y el manejo sustentable del agua es particularmente alarmante en el Ecuador (Galárraga, 2000). Esto dado que en países en vías de desarrollo, el 90% del agua residual doméstica e industrial no recibe tratamiento previo a su descarga en ríos y océanos, provocando la contaminación orgánica e inorgánica de estos cuerpos de agua (Benitez, 2015). Esta contaminación implica que muchos ríos, a pesar de tener agua corriendo por su cauce, no tengan agua apta para riego, ganadería o generación eléctrica; provocando así una escasez de agua limitada por la calidad y no por la cantidad. Además, existen consecuencias importantes en la gestión de los recursos hídricos, ya que la falta de agua en las zonas bajas aumenta la presión sobre los páramos y ecosistemas de altura, para suplir de agua de buena calidad a las poblaciones locales (Garzón & et al., 2012). Por estas razones, resulta necesario tratar las aguas residuales antes de verterlas en los ríos de la ciudad.

La biorremediación es una herramienta importante en el tratamiento de aguas residuales, tanto domésticas como industriales. Este proceso usa microorganismos para eliminar o reducir las concentraciones de desechos peligrosos en un sitio contaminado (Wu, 2017). Entre los microorganismos empleados, se utilizan las microalgas; debido a su capacidad de asimilar compuestos que son considerados como contaminantes en el agua residual (nitrato, fosfato, amonio) como complemento para su crecimiento y desarrollo (Umamaheswari & Shanthakumar, 2016). Además, estos microorganismos se caracterizan por su capacidad de fijar el carbono y transformar la energía solar en energía química, la cual se almacena en su biomasa (Mata, Martins, & Caetano, 2010). Dicha biomasa se puede utilizar para la producción de cosméticos, fármacos y como fuente alimenticia (Zhao, y otros, 2014).

Emplear microalgas en procesos de biorremediación confiere la ventaja de no requerir la adición de una fuente de carbono al medio, convirtiéndose en grandes sumideros de CO<sub>2</sub> (Olearte & Valencia, 2016). No obstante, la actividad de las microalgas se vuelve más efectiva cuando se combina con las bacterias, en los denominados consorcios microalga-bacteria. Un consorcio es una asociación de especies formado por una relación de sinergia. Los consorcios tienen la capacidad de degradar la materia orgánica y contaminantes del agua residual y a la vez recuperar los nutrientes mediante la absorción de estos en la biomasa algal (González, Molinuevo, & García, 2011).

El uso de consorcios microalga-bacteria confiere diversas ventajas, como por ejemplo: reducen costos energéticos en plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que no se necesita aereación de los reactores. Estos consiguen eliminar en una sola etapa la materia orgánica, el fósforo y el nitrógeno del agua residual, lo que garantiza que las aguas vertidas en los ríos tengan niveles de descarga permisibles (Barreiro, 2019). Presentan amplia especificidad a diferentes sustratos lo cual aumenta la eficiencia de remoción de compuestos (Gonçalves, Pires, & Simões, 2017). Además, tienen mejor supervivencia durante la limitación de nutrientes al compartir diferentes metabolitos entre las especies del consorcio (Fito & Alemu, 2018).

Existen dos formas de realizar el proceso de biorremediación de aguas residuales; *in situ*, elimina, disminuye o transforma los compuestos contaminantes en la zona afectada; y *ex situ*, realizando el tratamiento en plantas fuera del ambiente contaminado. Las técnicas de biorremediación *in situ* son menos costosas y disminuyen la generación de residuos a eliminar en la superficie (Suarez, 2013). También emplea organismos autóctonos o nativos del sitio contaminado, los cuales son de interés al ser degradadores naturales de los contaminantes presentes (Díaz, y otros, 2017).

Estudios previos sugieren que los consorcios nativos identificados en un entorno contaminado pueden reducir eficazmente los contaminantes orgánicos y nutrientes de las aguas residuales municipales (Fito & Alemu, 2018). Además, estas cepas de microalgas y bacterias tienen mejor capacidad de adaptación al ambiente local con tasas de crecimiento mayores, en comparación con microorganismos introducidos (Zhou, y otros, 2012). Estas características hacen que los consorcios nativos tengan un alto potencial e interés para la biorremediación (Guamán & Gonzáles, 2016). Adicionalmente, dentro de la biodiversidad natural probablemente existen microorganismos que se pueden aprovechar para incrementar la efectividad de remoción de compuestos. Por lo tanto se presenta una oportunidad de estudio en países como Ecuador, donde su gran biodiversidad permite realizar una bioprospección de consorcios nativos, a fin de desarrollar un sistema adecuado para el tratamiento de aguas residuales.

Afortunadamente, hoy en día se cuenta con las herramientas y metodologías adecuadas para ampliar y profundizar el estudio de la abundancia, diversidad e interacciones microalga-bacteria con capacidad de remediación de aguas residuales (Cooper & Smith, 2015). La metagenómica comprende el estudio de las comunidades microbianas y secuencias del ADN total extraído de una muestra ambiental (Bonilla, y otros, 2008). La ventaja de esta, es que permite obtener gran cantidad de información sobre microorganismos que actualmente no son cultivables (Jones, 2018). Los análisis metagenómicos incluyen un conjunto de tecnologías genómicas para acceder directamente al material genético de comunidades enteras de organismos (Thomas, Gilbert, & Meyer, 2012); así como herramientas bioinformáticas que hacen posible la identificación y anotación funcional de todos los genomas presentes en un microbioma (Ospino & et al., 2018).

Analizar las diferencias de los metagenomas permite entender si existe o no una composición ideal dentro de un consorcio para el proceso de remediación. Así, se emplea

técnicas de secuenciamiento de última generación tales como Illumina, Pacbio (Goodwin, McPherson, & McCombie, 2016); y recientemente la plataforma Oxford Nanopore MinION (ONT, Reino Unido), utilizada en el presente estudio.

El MinION es un secuenciador de genoma portátil y económico que produce lecturas largas de alta calidad ( $> 10,000$  pb), lo cual facilita el ensamblaje de metagenomas, el estudio del perfil taxonómico y la anotación funcional (Laver & y otros, 2015). El equipo utiliza la tecnología de secuenciación por nanoporos, los cuales están dispuestos en membranas de polímeros resistentes a la electricidad (celdas de flujo). Este secuenciamiento se basa en medir los cambios de corriente iónica, a medida que las moléculas biológicas pasan a través del nanoporo o junto a este. La corriente iónica a través de los nanoporos tiene un voltaje establecido y cada analito que atraviesa el poro causa una interrupción específica en la corriente. La información se obtiene en tiempo real y se usa para identificar la molécula en estudio (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

Existen diversos estudios metagenómicos en los que se ha empleado la plataforma de secuenciación MinION, como por ejemplo la investigación de (Samson, y otros, 2019) quienes estudian la composición taxonómica y perfil funcional de comunidades microbianas en los ríos Ganges y Yamuna (India). De igual forma, la propagación epidémica y origen del brote de fiebre de Lassa (Kafetzopoulou, y otros, 2019); el estudio de reptiles en la selva del Chocó ecuatoriano para identificación de especies (Pomerantz, y otros, 2018); así como el estudio de muestras de agua de playa y agua residual para caracterizar las comunidades bacterianas y sus repertorios de virulencia (Fresia, y otros, 2019).

Adicionalmente, la tecnología del MinION permite analizar el ADN ambiental y a su vez estudiar la biodiversidad, conservación y contaminación de las muestras. Se reporta el uso del MinION para estudiar la composición microbiana de cuerpos de agua dulce y salina; suelo; materia fecal; permafrost; entre otros (Oxford Nanopore Technologies, 2019). Hasta la fecha

son escasos los estudios que reportan el uso de este secuenciador para analizar la diversidad de consorcios nativos microalga-bacteria, por lo que este trabajo tiene como base un estudio previo de consorcios nativos de la Amazonía ecuatoriana.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue el de caracterizar la diversidad a nivel de metagenomas de seis consorcios microalga-bacteria nativos provenientes de Galápagos, Ecuador. De esta manera se pretendía determinar si las diferencias entre consorcios pueden influir en la efectividad del proceso de remediación. Para ello se utilizó la plataforma de secuenciación de última generación MinION, y se realizaron análisis metagenómicos de las diversidades alfa y beta de los consorcios. Además, se comparó la diversidad y abundancia de microalgas y bacterias en los distintos consorcios estudiados. Por último, se evaluó si las diferencias existentes en el medio de origen de los consorcios influyen en la composición taxonómica y diversidad.

Esta investigación se enfocó en consorcios microalga-bacteria provenientes de las Islas San Cristóbal e Isabela de Galápagos, para comprobar si en la biodiversidad existen microorganismos nativos que incrementen la efectividad en el tratamiento de aguas residuales. Este archipiélago se caracteriza por tener una gran variedad de especies endémicas, debido al aislamiento geográfico de sus islas (Benavides, y otros, 2009), pese a esto en la actualidad no se tiene información acerca de su biodiversidad microbiana. Por este motivo, la secuenciación de última generación por nanoporo y la metagenómica facilitó el descubrimiento de bioactividades no descritas en consorcios microbianos nativos; permitiendo explorar la diversidad y riqueza de estos consorcios con particular interés en biorremediación.

Los beneficiarios de este estudio serán la comunidad científica y la industria dedicada al tratamiento de aguas residuales. En el primer caso el estudio introduce una nueva tecnología en el país, la cual generará nueva información genómica para ampliar las bases de datos. También aporta nuevo conocimiento acerca de la diversidad y complejidad de consorcios

nativos microalga-bacteria. Por su parte, los resultados de este proyecto potenciarán la utilización de consorcios microalga-bacteria para desarrollar tecnologías rentables y sostenibles en la industria de remediación de aguas residuales. Así mismo, permitirá entender si la diversidad de los consorcios se puede aprovechar para mejorar estos sistemas de tratamiento.

## MÉTODOS

### **Colección de Muestras y Propagación de los Consorcios**

Se colectaron un total de seis de consorcios microalga-bacteria en las islas San Cristóbal e Isabela en Galápagos. En los diferentes sitios de muestreo, se tomaron datos como las coordenadas geográficas y parámetros físico-químicos del ecosistema nativo de cada consorcio (Figuras 2 y 3). Todos los consorcios se mantuvieron crioconservados hasta su propagación. Posteriormente, se propagaron los consorcios en agua residual estéril en biorreactores del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la USFQ. Previamente, se caracterizaron los parámetros físico-químicos del agua residual de la USFQ. Este experimento se realizó por triplicado, cabe señalar que en los ensayos 2 y 3 se utilizó un agua residual distinta al primer ensayo. Cada muestra se incubó en 65 ml de agua residual estéril con 2.5 ml de inóculo (consorcio microalga-bacteria) en un agitación constante a 100 revoluciones por minuto (rpm), 24°C, con fotoperiodos 12:12. Cada fase de propagación tuvo una duración aproximada de 15 días y todas las muestras fueron propagadas hasta la fase 3. Con los datos colectados en los sitios de muestreo, se construyó la metadata empleada en los análisis de alfa y beta diversidad (Anexo A).

### **Concentración de Biomasa y Extracción de ADN**

Se concentró la biomasa de cada una de las muestras, para ello se tomó 7,5ml de cada consorcio y se realizaron 4 ciclos de centrifugación durante 8,5min a 9000 rpm. Luego se pesó la biomasa concentrada y se realizó la lisis celular mediante nitrógeno líquido. Posteriormente, para la extracción de ADN se empleó el kit DNeasy PowerSoil® (Qiagen, 2017) según las instrucciones del fabricante. Cabe recalcar que el protocolo añadió un paso extra, el cual consistió en realizar un vórtex de 45 minutos a máxima velocidad para el paso de lisis celular.

### **Purificación del ADN**

Se probó un protocolo de purificación: SPRI Based Size Selection (Beckman Coulter, 2012) para el tercer ensayo de secuenciación. Se empleó un volumen de muestra de 1  $\mu\text{L}$  y concentración (20 ng/  $\mu\text{L}$ ); así como unas beads magnéticas de 0.65X de radio. Con esto se garantizó que los fragmentos de ADN resultantes sean mayores a 500 pb.

### **Cuantificación y Visualización del ADN**

Se analizó la concentración y calidad del ADN extraído utilizando el cuantificador fluorométrico Qubit<sup>TM</sup> 4 (Thermo Fisher Scientific, 2018). Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante y se colocó 2  $\mu\text{L}$  de muestra para cuantificar. Para la visualización del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y se comprobó que el material genético no se encuentre degradado.

### **Secuenciación mediante Oxford Nanopore MinION y Basecalling**

Como primer paso se realizó una comprobación de la celda utilizada para secuenciar (flow cell), para ello se utilizó el Software MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, 2019). Posteriormente, se realizó la preparación de las librerías genómicas utilizando el protocolo de Nanopore “Rapid Barcoding Sequencing SQK-RBK004”, colocando 400 ng de ADN de cada uno de los seis consorcios microalga-bacteria y se ajustó el volumen a 7.5  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. Los metagenomas se fragmentaron y se les colocó un código de barras único en cada una de las muestras (código de barras del RB01 al RB06). Además, se añadieron los adaptadores en los extremos de las cadenas de ADN, necesarios para el posterior secuenciamiento.

Finalmente, se cargó la celda de flujo del MinION empleando los buffers de carga y la librería de ADN siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Oxford Nanopore Technologies, 2017). El secuenciamiento se lo realizó usando una Workstation de máxima potencia (8

núcleos), donde se programó una corrida de secuenciación de 24 horas con el programa MinKNOW, con la opción de basecalling en tiempo real y el output final en formato fastq. Este procedimiento fue el mismo para los tres ensayos de secuenciación.

En el tercer ensayo el basecalling tuvo que ser completado usando el programa GUPPY (Wick, Judd, & Holt, 2019) y las secuencias fastq resultantes del MinKNOW.

### **Análisis de Calidad de Secuencias Crudas y Demultiplexing**

La calidad de las secuencias de cada ensayo se analizó usando el programa FastQC (Droop, 2016). Este emplea como input las secuencias fastq del nanopore y determina el Phred Score, que representa la probabilidad de que la base asignada sea correcta (Liao, Satten, & Juan, 2017). Luego se corrió el programa MultiQC (Ewels, Magnusson, Lundin, & Käller, 2016) para unificar en un solo informe, todos los resultados del FastQC. Después se removieron los códigos de barras de las secuencias y se separaron las lecturas correspondientes a cada consorcio, para esto se corrió en la terminal de linux el programa Porechop (GitHub, 2017).

### **Alfa diversidad**

La alfa diversidad permite evaluar la diversidad local dentro de un consorcio, tomando en cuenta tanto la riqueza como la homogeneidad de especies presentes. Además, determina si existen grupos dominantes dentro de un consorcio o hábitat específico (Cox, Cookson, & Moffatt, 2013).

Se empleó el programa Flye (Kolmogorov, Yuan, Lin, & Pevzner, 2019) con las secuencias crudas obtenidas directamente del MinION. Este programa ensambla los metagenomas con el algoritmo *k-mer*. Este método metagenómico compara el contenido completo de las secuencias en estudio, en base a la similitud de lecturas que comparten los mismos nucleótidos de longitud *k*. De esta forma se van agrupando las lecturas con la misma longitud *k* y van formando conjuntos (*clusters*) distintos (Benoit, y otros, 2016).

Luego se utilizó el programa SqueezeMeta (Tamames & Puente, 2019) para obtener el número de lecturas correspondientes a cada genoma ensamblado y clasificado taxonómicamente. Adicionalmente se obtuvieron las secuencias de referencia de cada genoma ensamblado. Con esta información se elaboró una tabla .biom y se realizó el cálculo de los índices de alfa diversidad: Shannon, Pielou y Riqueza en el Software R con el paquete vegan (Oksanen & al, 2019). Finalmente, se empleó el programa Prism8, versión 8.3.1 (GraphPad Prism, 2019) para calcular la riqueza por consorcio y evaluar su significancia estadística con la prueba Anova. Para ello se utilizaron los datos de las tablas .biom de SqueezeMeta y se corrió el programa con la opción “*Grouped*”, tres réplicas y los datos normalizados de cada muestra.

### **Beta diversidad**

Es una medida de la variación en la composición de especies entre diferentes consorcios o hábitats (Sonco, 2013). Refleja las diferencias entre las comunidades biológicas de una determinada región (Baselga & Gómez, 2019). Se analizó la diversidad beta entre los seis consorcios estudiados en base a la información obtenida en los tres ensayos de secuenciación. Se utilizó el programa Simka (Benítez, y otros, 2018), el cual emplea el algoritmo *k-mer* para calcular las matrices de distancia entre las muestras estudiadas. Como input se ocuparon las secuencias fastq resultantes del programa Porechop y la metadata en formato .csv “valores separados por comas”. Se seleccionó la opción --max-reads 0 para que se normalicen los datos (lecturas) de cada muestra. Finalmente, se computaron matrices de distancia simples y complejas.

### **Permanova**

Se realizó la prueba estadística Permanova en el Software R version 3.6.0 utilizando el paquete *vegan* (Oksanen & al, 2019) y la fórmula *adonis*. Se corrió la prueba con 999 permutaciones, en base a la matriz de beta diversidad de Bray Curtis en formato .txt obtenidos del programa Simka y la metadata (Anexo A) en formato .txt.

### **Asignación taxonómica**

En todos los ensayos de secuenciamiento se analizó el perfil taxonómico utilizando el programa Kaiju (Menzel, Lee, & Krogh, 2016). Este emplea las secuencias fastq comprimidas en formato .zip y las compara con la base de datos “NCBI Blast nr+euk” para lograr la asignación taxonómica de los metagenomas secuenciados, tanto de eucariotas como de procariotas. Se corrió este programa con la opción *web server* y de esta forma no se requirió descargar el programa ni las bases de datos.

## RESULTADOS

Se muestran los resultados obtenidos del secuenciamiento de seis consorcios microalga-bacteria de Galápagos. Los consorcios G1, G2, G3 y G4 provienen de la Isla San Cristóbal. Mientras que los consorcios G5 y G6 provienen de la Isla Isabela.

### Secuenciamiento y Análisis de Datos Técnicos

Se realizaron tres repeticiones del secuenciamiento, mismas en las que se variaron parámetros como: agua residual (ensayo 1 diferente agua que ensayos 2-3); extracción de ADN (ensayo 1 diferente a ensayos 2-3) y selección por tamaño de los fragmentos (solo en el ensayo 3) para tener lecturas más largas.

En la Tabla 1 se muestra los diferentes parámetros tanto de la secuenciación como del análisis de calidad de las lecturas secuenciadas. En base a la cantidad de lecturas secuenciadas por el MinION, se observa que el ensayo 1 es el que logra mayor cantidad de lecturas secuenciadas; lo cual puede estar dado por el mayor número de poros activos en la celda de flujo del MinION durante este evento de secuenciación. El ensayo 3 presenta la mejor calidad de lecturas de los tres ensayos, puesto que su Phred Score es alto y la longitud de las secuencias al ser la mayor va a permitir un buen ensamblaje de los genomas. A pesar de ello, los Phred Score de los ensayos 1 y 2 se encuentran dentro del rango esperado para el MinION (Shin, y otros, 2018).

Después de realizar el demultiplexing de las secuencias obtenidas se recuperó la siguiente cantidad de información: 4,1 GB en el ensayo 1; 2 GB en el ensayo 2; y 521,7 MB en el ensayo 3. Cabe señalar que en todos los ensayos de secuenciamiento se encontraron los 6 códigos de barras asignados a cada muestra; sin embargo, con el ensayo 1 se logró recuperar la mayor cantidad de información.

## Alfa Diversidad

Se calculó el índice de Shannon (como medida de alfa diversidad total); además de la riqueza y homogeneidad de especies (como componentes individuales de la alfa diversidad). Para este análisis se unieron los datos de los 3 ensayos de secuenciación. Los cálculos se obtuvieron en base al número de genomas ensamblados e identificados taxonómicamente con el programa SqueezeMeta. En la Tabla 3 se muestra el resultado de los índices.

El índice de Shannon cuantifica la incertidumbre de predecir a qué especie pertenecerá un individuo tomado al azar de una muestra (Cox, Cookson, & Moffatt, 2013). Su valor puede variar entre 0 a 5; en donde a mayor valor de  $H'$  mayor incertidumbre y por tanto mayor diversidad de especies (Magurran, 2013). En base a este índice los consorcios más diversos son: G2, G4 y G5.

Se calculó también el índice de Pielou el cual mide la equidad u homogeneidad de un consorcio, es decir, la abundancia de cada especie y qué tan uniformemente se encuentra distribuida. Su valor va de 0 a 1. De esta forma 1 corresponde a consorcios donde todas las especies son igualmente abundantes, mientras que consorcios con valores cercanos a 0 indican la dominancia de una sola especie (Magurran, 1988). En base a esto los consorcios más diversos, al presentar menor dominancia de una sola especie son: G2, G4 y G5, lo que concuerda con lo esperado debido al índice de Shannon.

Por su parte, la riqueza se refiere al número de especies diferentes presentes en un consorcio (Magurran, 2013). Los valores de riqueza en este caso se refieren al número de genomas completos identificados taxonómicamente por el programa empleado. Se efectuó una prueba Anova para ver diferencias significativas en la riqueza entre los consorcios. Con un valor  $P = 0.9870$  se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa en la riqueza de los consorcios estudiados.

Para ver la influencia de ciertas variables experimentales y ambientales en la alfa diversidad, se ejecutó la prueba estadística Anova con los diferentes índices (Tabla 4). Se comprobó que ni el ensayo de secuenciamiento, ni el agua residual empleada para la propagación de los consorcios, influyen en la alfa diversidad (valor  $P > 0.05$ ). Con respecto a las variables ambientales, se descubrió que ciertos parámetros físico-químicos de los lugares de origen de cada consorcio, pueden influir en la alfa diversidad. Tanto en Shannon como Homogeneidad se observó la significancia de las mismas variables (valor  $P < 0.05$ ): Altitud, Temperatura, Oxígeno Disuelto (DO), Conductividad, pH, Turbidez, Origen, Cloro, Sulfato, Bario, Manganeso, Zinc, Calcio, Magnesio y Sodio. Mientras que solo las variables Isla y Sodio influyen en la Riqueza de los consorcios.

Se reporta que la riqueza de especies es sensible a las condiciones físicas de los ecosistemas, la heterogeneidad de hábitats y las interacciones bióticas (Magurran, 2013). Esto corrobora el hecho de que las variables ambientales, es decir, los parámetros físico-químicos de los sitios de muestreo sí pueden estar influyendo en la diversidad de los consorcios.

### **Beta Diversidad**

Se analizó en base a matrices de distancia, basadas en índices de disimilitud por pares. Se calculó el índice de Bray–Curtis, el cual mide la diferencia en la composición y abundancia de cada especie presente (Anderson, Crist, Chase, Vellend, & y otros, 2011). Se encontró un índice de Bray-Curtis entre 0,77 y 0,99 para los seis consorcios en los tres ensayos de secuenciamiento. La matriz de distancia se obtuvo con el programa SIMKA en base al método de *k-mers* y ASV (Amplicon sequence variance). Las menores distancias resultaron de las comparaciones del mismo consorcio en los diferentes ensayos de secuenciamiento (índice entre 0,77-0,88). Mientras que al comparar entre los diferentes consorcios, los valores del índice están entre 0,88 a 0,99. El índice de Bray-Curtis va de 0 a 1, donde 0 significa que los dos

consorcios comparten las mismas especies; mientras que 1 significa que no comparten ninguna especie (Vavrek, 2018).

Para ver la influencia de ciertas variables experimentales y ambientales en la beta diversidad, se realizó la prueba estadística “permanova”. El permanova mide la respuesta simultánea de una o varias variables en un diseño experimental Anova, se basa en cualquier medida de distancia y emplea permutaciones (Anderson, 2017). Se unificaron las corridas de secuenciamiento para obtener un mayor poder estadístico de comparación. Como resultado se comprobó que ninguna de las variables experimentales: “secuenciamiento” y “agua residual” influyen en la beta diversidad de los consorcios. En cuanto a las variables ambientales se encontró que aquellas significativas fueron: Isla, Origen, Altitud, Temperatura, DO, pH, Conductividad, Turbidez, Flúor, Sulfato, Magnesio, Zinc, Manganeseo, Cloro, Calcio, Sodio, Bario. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Posteriormente se evaluó la influencia en conjunto entre dos variables, únicamente la interacción “Isla con Altitud” tienen un impacto en conjunto (valor  $P = 0.006$ ) como se demuestra en la Tabla 5.

### **Asignación taxonómica**

Al realizar la asignación taxonómica de las lecturas obtenidas, el que mayor cantidad de asignaciones tuvo fue el ensayo 2. Por esta razón el análisis de composición taxonómica se basa únicamente en este ensayo de secuenciamiento. Se logró clasificar con éxito entre el 26 y 69% de las lecturas (Tabla 2).

En la Figura 1 se compararon los filos más representativos en los seis consorcios, es decir, los filos más abundantes en cada consorcio. Cabe señalar que esta clasificación está basada en el total de lecturas clasificadas para cada consorcio, esta información se presenta en la Tabla 2. En todos los consorcios se representa más del 50% del total de lecturas clasificadas.

Como se muestra en la Figura 1 los grupos más representados tienden a ser similares. Esto también se muestra en los *krona charts* obtenidos del programa Kaiju (Figuras 4 y 5). Sin embargo, se observa que existen diferencias en la abundancia relativa de los filos.

Se encontró que cada consorcio tiene una composición taxonómica única. En base a la Figura 1 se infiere que: el consorcio G2 tiene mayor cantidad de Proteobacteria (42318 lecturas). El consorcio G1 tiene la mayor cantidad de Chlorophyta (3473 lecturas), además junto con el consorcio G3 presentan el grupo Alveolata. El consorcio G3 tiene la mayor cantidad de Terrabacteria (15238 lecturas) y es el único que tiene el filo Amoebozoa y Poxviridae.

## DISCUSIÓN

Se estudió la diversidad ecológica presente dentro de cada consorcio, para ello se calculó la alfa diversidad. Los dos índices calculados fueron Shannon y Pielou, el primero toma en cuenta tanto la riqueza como abundancia de especies. Los consorcios presentan un índice de Shannon en un rango entre (1,14 a 2,24). Se reporta que los valores de este índice usualmente están entre 1,5 y 3,5 (Magurran, 2013), por tanto el rango obtenido está dentro de lo esperado. Los valores de este estudio son también comparables a lo encontrado en consorcios microalga-bacteria nativos de la Amazonía (Posso, 2019), así como estudios de diversidad con muestras ecológicas (Iannacone & Alvariño, 2007; Morelli & Verdi, 2014).

El índice de Shannon se correlaciona positivamente con la riqueza y la homogeneidad de las especies (Silva, y otros, 2010); esto se demuestra con los valores resultantes del índice de Pielou, el cual mide la homogeneidad de especies presentes. El rango de valores obtenido de (0,32 a 0,64) es menor al esperado para muestras ecológicas (Iannacone & Alvariño, 2007; Morelli & Verdi, 2014). Posiblemente la adaptación de los consorcios al nuevo medio de agua residual provocó una selección de ciertas especies, lo cual cambió la dinámica de las poblaciones, proliferando las especies que le ayudan a la comunidad microbiana a sobrevivir (Chevin & Lande, 2011).

Analizar si los índices obtenidos son comparables con lo observado en muestras ecológicas, es importante tomando en cuenta que los consorcios en estudio fueron adaptados a un nuevo ambiente de agua residual. Como consecuencia los resultados no reflejan la composición del consorcio en su medio de origen, sino la de los consorcios en el nuevo ambiente a remediar. Conforme a los resultados, si bien la riqueza de especies no se ve afectada por esta nueva adaptación, la abundancia relativa de las especies (homogeneidad) sí parece variar con respecto a lo reportado en muestras ecológicas.

Con el índice de Shannon se desea tener un consorcio donde todas las especies tengan la misma abundancia y alta entropía, lo que se traduce en una alta diversidad (Shannon & Weaver, 1949). En base a este índice los consorcios más diversos son G2 ( $H' = 2,077$ ), G4 ( $H' = 2,24$ ) y G5 ( $H' = 1,96$ ). Un resultado similar se obtuvo con el índice de Pielou en donde los consorcios G2, G4 y G5 presentan la mayor homogeneidad y son los más diversos. Ambos valores confirman una diversidad relativamente alta en la mitad de los consorcios comparada con otros estudios (Stamper, Walch, & Jacobs, 2003).

Esto no implica que los consorcios G1, G3 y G6 con un índice de Pielou más bajo; se deban descartar para ensayos de biorremediación. Existen estudios que demuestran que la dominancia de unas pocas especies confiere una ventaja sobre la gran riqueza de especies; al producir altas cantidades de biomasa reduciendo los contaminantes del agua residual (Saavedra, y otros, 2016). Por su parte, el análisis de riqueza mostró que no hay diferencia significativa entre los consorcios; lo cual sugiere la complejidad de estos. Se sabe que los consorcios microbianos complejos se adaptan mejor en ambientes a remediar y degradan con mayor facilidad las toxinas (Krustok, 2016).

Posteriormente se realizó el análisis de beta diversidad para ver si existen diferencias en la composición de especies entre los consorcios. Para esto se utilizó la información de los tres eventos de secuenciación. De este modo se obtuvieron comparaciones entre los diferentes consorcios y entre el mismo consorcio en los tres ensayos de secuenciación. Con este análisis se logró confirmar lo que se vio en alfa diversidad, es decir, que existen diferencias entre consorcios. Se obtuvo un índice de Bray-Curtis alto para los seis consorcios. El rango del índice calculado está entre 0,77 a 0,99. Estos valores son mayores a los reportados en estudios de diversidad con muestras ecológicas (Xu, y otros, 2014; Fresia, y otros, 2019).

La tendencia encontrada es que el índice es menor entre los mismos consorcios de diferentes secuenciamientos (0,77-0,88). Y mayor entre distintos consorcios (0,88-0,99). Se

esperaría tener valores cercanos a 0 al comparar los mismos consorcios en los diferentes ensayos de secuenciación, dado que al ser la misma muestra deberían compartir las mismas especies. Debido a que los valores fueron altos, se sugiere que el índice parece estar sobreestimando la diversidad observada.

Una posible explicación es la forma en como se llevaron a cabo las repeticiones de la secuenciación (diferencias en: el ADN a ser secuenciado, cantidad de información obtenida, el tiempo de secuenciación, la calidad y longitud de las secuencias); sumado a las diferentes aguas residuales utilizadas para la propagación de los consorcios. Sin embargo, se realizó la prueba estadística “Permanova” y se encontró que las variables “agua residual” y “secuenciamiento” no influyen en la beta diversidad. Por tanto, la técnica de como se extrajo la muestra no causa la sobreestimación de este índice.

De este modo, lo que pudo ocasionar la sobre estimación del índice es la baja cobertura y la alta tasa de error del MinION del 12% (Goodwin, McPherson, & McCombie, 2016). Esto influye en la agrupación en *clústers* de las secuencias (método de *k-mers*), lo cual es la base para calcular las distancias entre muestras. Así también, se puede atribuir a las diferencias a nivel de secuencias entre los consorcios; y la gran parte de lecturas que no lograron ser clasificadas (31-74% lecturas), debido a que las bases de datos para microalgas no son completas y existe gran cantidad de “*dark matter*” en estudios metagenómicos (Brum, y otros, 2016). Por ello los porcentajes de lecturas no clasificadas parecen ser consecuentes y son comparables con la investigación de (Posso, 2019).

A pesar de la sobreestimación del índice de beta diversidad, queda claro que existen más diferencias y valores más altos cuando se compara entre distintos consorcios que dentro del mismo consorcio en los diferentes ensayos de secuenciación. Esto demuestra que efectivamente la diversidad entre consorcios es distinta, presentando diferencias en su composición taxonómica.

Por otra parte, se realizó el análisis de composición taxonómica de cada consorcio. Dado que tuvo una mayor cantidad de lecturas asignadas taxonómicamente, se determinó que el ensayo de secuenciamiento 2 era el más adecuado para este análisis. Además, este tuvo mayor cantidad de información después del basecalling que el ensayo 3 y la concentración de ADN usado como input para el secuenciamiento fue mayor que la del ensayo 1.

Al evaluar los principales filos, se encontró que cada consorcio tiene una composición taxonómica única, ya que existen diferencias en la abundancia relativa de los filos. Como se muestra en las Figuras 1, 4 y 5 los grupos más representados tienden a ser similares. Esto se debe a la relación simbiótica dentro del consorcio, en donde las microalgas producen el oxígeno, que usan las bacterias para oxidar la materia orgánica. Y las bacterias aportan el CO<sub>2</sub> que las microalgas ocupan para sintetizar biomasa fotosintética (González, Molinuevo, & García, 2011).

La composición microbiana encontrada (Figura 1), es similar a la composición taxonómica hallada en consorcios nativos de la Amazonía ecuatoriana (Posso, 2019), también coincide con lo reportado en estudios de comunidades bacterianas en plantas de tratamiento de agua residual, en donde los filos más abundantes en consorcios biorremediadores son: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes y Terrabacteria (Ju & Zhang, 2015; Eschenhagen, Schuppler, & Röskea, 2003; Wang, y otros, 2012). Esto concuerda con el resultado de este estudio, en todos los casos salvo por las Actinobacterias que no se encontraron dentro de los filos más abundantes.

El hecho de que exista una similitud entre la composición taxonómica de consorcios provenientes de plantas “PTAR” y consorcios nativos de Galápagos, podría deberse a la presencia de aguas residuales en los cuerpos de agua de donde se tomaron las muestras (Posso, 2019). Podría ser esto una verdad para los consorcios G1 y G6 que provienen de las tomas de captación de agua “Cerro Gato” y “El Chapín 1”, los cuales presentan problemas de

contaminación. Dichos sitios no están debidamente protegidos y no cuentan con rejillas de retención de sólidos ni sedimentadores (Martin, y otros, 2015; Rueda, López, & Nagahama, 2007).

La presencia de filos similares en todas las muestras puede atribuirse a que en los consorcios existen especies con ciertas actividades que parecen ser esenciales en el proceso de biorremediación (Shetty, y otros, 2019; Qiang, Kurade, & Jeon, 2017). En la Figura 2, se observa que los consorcios presentan grupos que son de interés en este ámbito. Como el filo de Proteobacterias que junto con el filo FCB (correspondiente a los Bacteroidetes) interactúan con las macro y microalgas (Krustok, 2016); debido a que estimulan su crecimiento y promueven su morfogénesis. De esta forma ambos filos se reportan como dominantes en estudios de tratamiento de aguas residuales (Matsuo & y otros, 2005).

Igualmente se encontraron las microalgas Chlorophyta y Terrabacteria, que están presentes comúnmente en tratamientos de agua residual (Barrera, y otros, 2008; Shanthala, Hosmani, & Hosetti, 2009). Estos dos grupos captan el nitrógeno y el fósforo y lo difunden a través de su pared celular disminuyendo su concentración en aguas residuales, son microorganismos fotosintéticos que al aumentar el pH del agua provocan la precipitación del fósforo y la volatilización del amonio (Delgadillo, Lopes, Taidi, & Pareau, 2016). En conjunto, todos estos organismos aportan al metabolismo global de cada consorcio.

Las diferencias en la abundancia y composición taxonómica de los principales filos pueden atribuirse al medio de origen de cada consorcio. Es sabido que la diversidad de especies es sensible a las condiciones físicas y heterogeneidad de los ecosistemas (Magurran, *Measuring Biological Diversity*, 2013). Corroborando el hecho de que las variables ambientales, es decir, los parámetros físico-químicos de los sitios de muestreo puedan influir en la diversidad de los consorcios. Así se verificó con pruebas estadísticas de la influencia de variables ambientales en la alfa y beta diversidad; se vio que tanto “Isla” como “Sodio” pueden influir en la alfa

diversidad (Tabla 4). Esto coincide con lo esperado, tomando en cuenta los diferentes hábitats de los cuales provienen los consorcios. Existe una gran diferencia entre los consorcios de San Cristóbal y los de Isabela. Los primeros son consorcios que están en agua dulce (consorcios G1, G2, G3 y G4), es decir la conductividad del agua es baja ( $49-107 \text{ uS cm}^{-1}$ ), y la concentración de sodio es baja ( $5,60-7,32 \text{ mg/L}$ ). Mientras que los consorcios de Isabela (G5 y G6) vienen de lagunas donde hay aguas salobres, esto implica conductividades altas ( $3\ 532.3-5\ 840.4 \text{ uS cm}^{-1}$ ) y alta concentración de sodio ( $389,88-417,34 \text{ mg/L}$ ).

Adicionalmente, se ha reportado que la salinidad de ecosistemas acuáticos controla la composición de la comunidad bacteriana (Tang, y otros, 2012; Klier, y otros, 2018) ya que al influir en la densidad del medio requiere funciones osmorreguladoras de los organismos (Herlemann, y otros, 2011). La composición única de los consorcios de cada isla podría ser aprovechada para utilizarlos en medios contaminados específicos.

La fuente de agua salobre en los consorcios de Isabela se forma por grietas subterráneas que permiten una penetración importante de agua de mar (Lara, 2013). Cabe la posibilidad de que los consorcios G5 y G6 posean microorganismos con características para adaptarse a ambientes extremos, en comparación con los consorcios de San Cristóbal. Esto se apoya con un estudio de un lago salobre de Asia que determina la influencia de la salinidad y el pH en la diversidad de especies. Dichas condiciones son una buena fuente para la bioprospección de bacterias moderada o extremadamente halotolerantes que permanecerán activas (Raina, y otros, 2019). Sin embargo, esto se debería comprobar realizando la adaptación de estos consorcios a ambientes con condiciones extremas.

Por su parte, las variables ambientales que parecen estar influyendo en la beta diversidad (Tabla 5) son consistentes con la literatura, puesto que las algas necesitan trazas de calcio, magnesio, potasio, hierro, manganeso, azufre, zinc, cobre y cobalto para su crecimiento (Krustok, 2016). Es probable que la interacción “Isla-Altitud” influya en la diversidad entre

consorcios, tomando en cuenta que la altitud de los sitios de muestreo varía entre 5 a 202 msnm, presentando las dos muestras de Isabela las altitudes más bajas. La altitud incide en la distribución de las precipitaciones (Llorente & Morrone, 2003); a mayor altitud, la diversidad de especies aumenta en ecosistemas insulares (Hortal, y otros, 2013). Los datos obtenidos no son suficientes para afirmar esta correlación, puesto que si bien la diversidad del consorcio G6 es baja, el consorcio G5 sí presenta una diversidad alta.

Finalmente, al inicio del estudio se pensaba que la diversidad de los consorcios se puede aprovechar para mejorar la efectividad de la biorremediación, pero, ensayos de remoción llevados a cabo con los seis consorcios en estudio (Anexo B), determinan que no existe un consorcio superior en términos de degradación. Se demostró que todos los consorcios presentaron porcentajes de remoción de amonio, fosfato y nitrato elevados, confirmando su efectividad para el tratamiento de aguas residuales (Cárdenas & Ochoa, comunicación personal, 23 de marzo de 2020). En otras palabras, las capacidades de remoción de los seis consorcios son muy similares. Esto concuerda con (Posso, 2019) que encontró la misma tendencia en consorcios nativos de la Amazonía.

A futuro se recomienda realizar ensayos no en base a efectividad, sino a la tasa o tiempo de remoción de compuestos y analizar si las tasas se ven afectadas por la composición taxonómica a nivel de especies. Como también se recomienda estandarizar los protocolos de propagación de consorcios y secuenciación del ADN empleando las mismas condiciones. A fin de evitar diferencias significativas entre las repeticiones del secuenciamiento y tener resultados más robustos.

## CONCLUSIONES

En conclusión, se realizó la bioprospección de los seis consorcios microalga-bacteria nativos de Galápagos y se descubrió que sí existen diferencias a nivel de alfa y beta diversidad. Mismas que podrían ser atribuidas a las características del medio del cual se tomaron las muestras; ya que ninguna de las variables experimentales influyó en los resultados de diversidad. Los consorcios más diversos en base a los índices de Shannon y Pielou son G2, G4 y G5. Además, la composición taxonómica de cada consorcio es única. Los principales filos encontrados son Proteobacteria, Terrabacteria, Chlorophyta y FCB (Bacteroidetes); todos de interés en biorremediación. Por tanto, estos consorcios nativos tienen un gran potencial para el tratamiento de aguas residuales. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la plataforma MinION para analizar muestras ambientales y caracterizar la composición taxonómica de las especies presentes. Por último, si bien no se encontró una correlación entre la composición taxonómica y la efectividad de remoción; el estudio sí provee nueva información genómica que contribuye a las bases de datos y a estudios futuros de biodiversidad en consorcios microbianos nativos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA).  
*Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1-12.
- Armijos, E., & y otros. (2011). *Improving quality of life for the residents of Quito through an integrated sustainable water recovery project*.
- Barreiro, S. (2019). *Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de agua residual urbana*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Beckman Coulter. (2012). *SPRI Based Size Selection*. USA.
- Benítez, M., Champagne, P., Ramos, A., Torres, A., & Ochoa-Herrera, V. (2018). Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae. *Environmental Technology*, 1-9.
- Benitez. (2015). *Wastewater treatment for nutrient recovery with Ecuadorian native microalgae*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Benoit, G., Peterlongo, P., Mariadassou, M., Drezen, E., Schbath, S., & Lavenier, D. (2016). Multiple comparative metagenomics using multiset k-mer counting. *PeerJ Computer Science*(2).
- Benoit, G., Peterlongo, P., Mariadassou, M., Drezen, E., Schbath, S., Lavenier, D., & Lemaitre, C. (2016). Multiple comparative metagenomics using multiset k-mer counting. *PeerJ Computer Science*.
- Bonilla, G., Souza, V., & Eguiarte, L. (2008). Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1), 41-51.
- Braude, S., & Low, B. (2010). *An Introduction to Methods and Models in Ecology, Evolution, and Conservation Biology*. Princeton University Press.
- Bustamante, R., Collins, K., & Bensted, R. (2000). Biodiversity conservation in the

Galapagos Marine Reserve. *BULLETIN DE L'INSTITUT ROYAL DES SCIENCES NATURELLES DE BELGIQUE*, 3 1-38.

- Cárdenas, A., & Ochoa, V. (2019). *DATOS SWW GALAPGOS*. Laboratorio de Ingeniería Ambiental USFQ. Universidad San Francisco de Quito.
- Chevin, L., & Lande, R. (2011). Adaptation to marginal habitats by evolution of increased phenotypic plasticity. *J Evol Biol*(24), 1462–1476.
- Cooper, M., & Smith, A. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*(26), 147–153.
- Cox, M., Cookson, W., & Moffatt, M. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 22(1), 88-94.
- Delgadillo, 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.
- Droop, A. (15 de 06 de 2016). fqtools: an efficient software suite for modern FASTQ file manipulation. *Bioinformatics*, 32(12), 1883–1884.
- 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.
- Fito, J., & Alemu, K. (2018). Microalgae–bacteria consortium treatment technology for municipal wastewater management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1), 1-9.
- Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., Giménez, M., D'Alessandro, B., Afshinnekoo, E., & Iraola, G. (2019). Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome*, 7(1), 1-9.
- Galárraga, R. (15 de Febrero de 2000). *INFORME NACIONAL SOBRE LA GESTION DEL*

*AGUA EN EL ECUADOR*. Obtenido de

<https://www.cepal.org/DRNI/proyectos/samtac/InEc00100.pdf>

Garzón, M., & et al. (2012). La biofiltración sobre materiales orgánicos, nueva tecnología sustentable para tratar agua residual en pequeñas comunidades e industrias.

*Tecnología y ciencias del agua*, 3(3), 12-18.

Gonçalves, A., Pires, J., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403–415.

González, C., Molinuevo, B., & García, M. (2011). Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae–bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource Technology*, 102(2), 960-966.

Goodrich, J., Di Rienzi, S., Poole, A., Koren, O., Walters, W., Caporaso, G., . . . Ley, R. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell*, 2(158), 250–262.

Goodwin, S., McPherson, J., & McCombie, R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *NATURE*, 17, 333-351.

GraphPad Prism. (11 de 09 de 2019). *GraphPad Prism*. Obtenido de Prism8:

<https://www.scientec.com.mx/graphpad-prism/>

Guamán, M., & Gonzáles, N. (2016). *Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador*. Corporación para la investigación energética laboratorio de biotecnología energética. Quito: L. R. de Guillén.

Herlemann, D., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J., & Andersson, A.

(2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea.

Hortal, J., Carrascal, L., Triantis, K., Thébault, E., Meiri, S., & Sfenthourakis, S. (2013).

Species richness can decrease with altitude but not with habitat diversity. *PNAS*, E2149–E2150.

- Iannacone, J., & Alvarino, L. (2007). DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA DE COMUNIDADES ZOOPLANCTONICAS LITORALES DEL HUMEDAL PANTANOS DE VILLA, LIMA, PERU. *Gayana*, 71(1), 49-65.
- Ibarbalz, F., Figuerola, E., & Erijman, L. (2013). Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water Research*, 11(47), 3854–3864.
- Jones, K. (2018). Bioinformatic analysis of biotechnologically important microbial communities.
- Kafetzopoulou, L., Pullan, S., Lemey, P., Suchard, M., Ehichioya, D., Pahlmann, M., . . . Oestereich, L. (2019). Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*(363), 74–77.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*.
- 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 )*.
- Lara, D. (2013). *Calidad de Agua*. Obtenido de Parque Nacional Galápagos: <http://www.galapagos.gob.ec/calidad-de-agua/>
- Laver, T. H., & y otros. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Elsevier*, 1-8.
- Liao, P., Satten, G., & Juan, Y. (2017). PhredEM: a phred-score-informed genotype-calling approach for next-generation sequencing studies. *Genetic Epidemiology*, 41(5), 375–387.
- Liu, J., Li, J., & Tao, Y. (2017). Analysis of bacterial, fungal and archaeal populations from

- a municipal wastewater treatment plant developing an innovative aerobic granular sludge process. *World J Microbiol Biotechnol*, 14(33).
- Llorente, J., & Morrone, J. (2003). *Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones*. UNAM.
- Magurran, A. (1988). *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton University Press.
- Magurran, A. (2013). *Measuring Biological Diversity*. John Wiley & Sons.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 10(88), 3389–3401.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energy Rev*, 14(1), 217-232.
- Matsuo, Y., & y otros. (2005). Isolation of an Algal Morphogenesis. *Science*(307), 1598.
- Menzel, P., Lee, K., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7(11257 ).
- Morelli, E., & Verdi, A. (2014). Diversidad de macroinvertebrados acuáticos en cursos de agua dulce con vegetación ribereña nativa de Uruguay. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1160-1170.
- Municipio del Distrito Metropolitano de Quito. (11 de 11 de 2013). *Agencia Publica de Noticias de Quito*. Obtenido de [http://www.noticiasquito.gob.ec/Noticias/news\\_user\\_view/quito\\_tendra\\_plantas\\_de\\_t ratamiento\\_de\\_aguas\\_residuales--10312](http://www.noticiasquito.gob.ec/Noticias/news_user_view/quito_tendra_plantas_de_t ratamiento_de_aguas_residuales--10312)
- Oksanen, J., & al, e. (2019). *Community Ecology Package*.
- Olearte, E., & Valencia, M. (2016). *Evaluación del uso de la microalga*

*Chlorella vulgaris* en el tratamiento de aguas residuales industriales (vinazas).

Universidad nacional abierta y a distancia escuela de ciencias agrarias pecuarias y del medio ambiente ingeniería ambiental.

Ospino, K., & et al. (2018). Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. *Nova*, 16(29), 91-100.

Oxford Nanopore Technologies. (2017). *Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RBK004)*. Oxford, UK.

Oxford Nanopore Technologies. (2019). *A nanopore is a very small hole*. Obtenido de <https://nanoporetech.com/how-it-works>

Oxford Nanopore Technologies. (2019). *Analysis solutions for nanopore sequencing data*. Obtenido de Oxford Nanopore: <https://nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis>

Pomerantz, A., Peñafiel, N., Arteaga, A., Bustamante, L., Pichardo, F., Coloma, L., & Barrio, C. (2018). Real-time DNA barcoding in a rainforest using nanopore sequencing: opportunities for rapid biodiversity assessments and local capacity building. *GigaScience*, 7(4), 1-40.

Posso, S. (2019). *Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales mediante secuenciación de última generación*. Tesis de pregrado , Universidad San Francisco de Quito USFQ.

Qiagen. (2017). *DNeasy® PowerSoil® Kit*.

Qiang, J., Kurade, M., & Jeon, B. (2017). Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? *Trends in Biotechnology*, 1-15.

Raina, V., Panda, A., Mishra, S., Nayak, T., & Suar, M. (2019). Microbial Biodiversity Study of a Brackish Water Ecosystem in Eastern India: The Chilika Lake. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 47-63.

- Ruiz, L. (2018). *Análisis de Varianza (ANOVA): qué es y cómo se usa en estadística*.  
Obtenido de Psicología y Mente : <https://psicologiamente.com/cultura/analisis-de-varianza-anova>
- Samson, R., Shah, M., Yadav, R., Sarode, P., Rajput, V., & Khairnar, K. (2019).  
Metagenomic insights to understand transient influence of Yamuna River on  
taxonomic and functional aspects of bacterial and archaeal communities of River  
Ganges. *Science of the Total Environment*, 288–299.
- Shannon, C., & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana,  
IL: University Illinois Press.
- Shcherbakov, P., Dolnikova, G., Semenova, L., Lobakova, E., Selyakh, I., Chivkunova, O.,  
& Chekanov, K. (2016). Assessment of a New *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta) Ippas  
C-2015 Strain for Application in Poultry Wastewater Bioremediation.  
*Biotekhnologiya* (2), 72–81.
- Shetty, P., Boboescu, L., Pap, B., Wirth, R., Kovács, K., Bíró, T., . . . Allen, R. (2019).  
Exploitation of Algal-Bacterial Consortia in Combined Biohydrogen Generation and  
Wastewater Treatment. *Frontiers in Energy Research*, 7(52), 1-13.
- Shin, H., Lee, E., Shin, J., Ko, S.-R., Seok, H., Yong, C., . . . Kwan, B. (2018).  
Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae  
*Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing.  
*Scientific Reports*(8), 1-8.
- Silva, C., Ederson, J., Ana, T., Sousa, M., Vânia, S., & Oliveira, V. (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*, 3(20), 447–449.
- Sonawane, S., Dalvi, S., & Pokharkar, R. (2013). Macro Green Algae (Chlorophyta)

- Biodiesel Energy Liquid Fuel Synthesis by Single-Step In-situ Transesterification Method. *International Journal of Science and Research*, 1177-1180.
- Sonco, R. (2013). *refleja las diferencias entre las comunidades biológicas locales que hay en la región*. Tesis de Grado , Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Stamper, D., Walch, M., & Jacobs, R. (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*, 2(69), 852–860.
- Statgraphics Technologies. (2019). *statgraphics 18*. Obtenido de <http://www.statgraphics.com>
- Suarez, R. (2013). *GUÍA DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS*. Bogota: Universidad Libre.
- Tamames, J., & Puente, F. (2019). SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 1-10.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Qubit™ 4 Fluorometer*. Singapore.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(3).
- Vavrek, M. (11 de 03 de 2018). *Bray Curtis Dissimilarity*. Obtenido de Statistics How To : <https://www.statisticshowto.datasciencecentral.com/bray-curtis-dissimilarity/>
- Wick, R., Judd, L., & Holt, K. (2019). Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biology*(20), 1-10.
- Wu, J., Khan, M., Wu, J., Gao, Y., Wang, C., Korban, S., & Zhang, S. (2013). Molecular Determinants and Mechanisms of Gametophytic Self-Incompatibility in Fruit Trees of Rosaceae. *Journal Critical Reviews in Plant Sciences*, 53-68.

- Wu, Y. (2017). Water and Wastewater Purification Using Periphyton. *Periphyton*, 107-135.
- Xu, Z., Asser , M., Hansen, L., Jacquioid, S., & Sørensen, S. (2014). Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. *PLoS One*, 9(4).
- Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu , D., Schideman, L., Chai , X., & Zhao, Y. (2014). Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource Technology*(156), 322-328.
- Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., . . . Ruan , R. (2012). A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*(110), 448–455.

## TABLAS

**Tabla 1.-** Información obtenida de la secuenciación de consorcios microalga-bacteria

<b>Parámetro</b>	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>
Cantidad de lecturas	756,64 K	570,65 K	327.86 K
Información secuenciada	2.7 GB	1.35 GB	707 MB
Número de poros activos	1652	1485	1329
Tiempo (horas)	9	18	24
Phred Score	12.5	12.5	15-20
Longitud de las lecturas	1190 bp – 4172 bp	962 bp - 2938 bp	599 - 5092 bp

Se muestra los diferentes parámetros tanto de la secuenciación como del análisis de calidad de las lecturas secuenciadas. Se observa que el ensayo 1 es el que logra mayor cantidad de lecturas secuenciadas. El ensayo 2 se paró luego de 6 horas y se volvió a reanudar el equipo con el 30% de poros activos hasta las 18 horas. Posteriormente se unificó la información de este ensayo, obteniéndose los resultados presentados en la tabla. Por su parte el ensayo 3 no logró tener el 100% del basecalling en tiempo real ya que al finalizar el secuenciamiento el programa hizo el basecalling únicamente del 67%. Se empleó el programa GUPPY para completar el basecalling del 33% restante. Con ello se obtuvo la información mostrada en la tabla.

**Tabla 2.-** Total de lecturas clasificadas en cada consorcio

<b>Consorcio</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
<b>Porcentaje de lecturas (%)</b>	29	69	42	26	38	32
<b>Cantidad de lecturas</b>	26748	58823	41202	34867	16413	7161

Esta información se obtuvo a partir del programa Kaiju con la base de datos NCBI BLAST non-redundant protein “nr+euk” (Menzel, Lee, & Krogh, 2016).

**Tabla 3.-** Cálculo de la alfa diversidad para los seis consorcios microalga-bacteria

Consortorio	Índice de Shannon Wiener (H')	Índice de Pielou	Riqueza
G1	1.170	0.324	37
G2	2.077	0.584	35
G3	1.149	0.328	33
G4	2.243	0.647	32
G5	1.969	0.611	25
G6	1.425	0.407	33

**Tabla 4.-** Influencia de variables experimentales y ambientales en la alfa diversidad

Ensayos 1, 2 y 3			
Variables Experimentales	Valor P (Pr > F)		
	Shannon	Riqueza	Homogeneidad
vp			
Agua residual			
Variables Ambientales	Shannon	Riqueza	Homogeneidad
Altitud	*		*
Temperatura	*		*
Isla		*	
DO	*		*
Conductividad	*		*
pH	*		*
Turbidez	*		*
Origen	*		*
Cl	*		*
F			
SO4	*		*
Ba	*		*
Mn	*		*
Zn	*		*
Ca	*		*
Mg	*		*
Na	*	*	*

Las variables en amarillo con (\*) son significativas (valor  $P < 0,05$ ) luego de correr prueba Anova para los índices de alfa diversidad en R. Ninguna de las variables experimentales influye en la alfa diversidad encontrada. En cuanto a las variables ambientales tanto para la alfa diversidad total (índice de Shannon) como para la Homogeneidad fueron significativas:

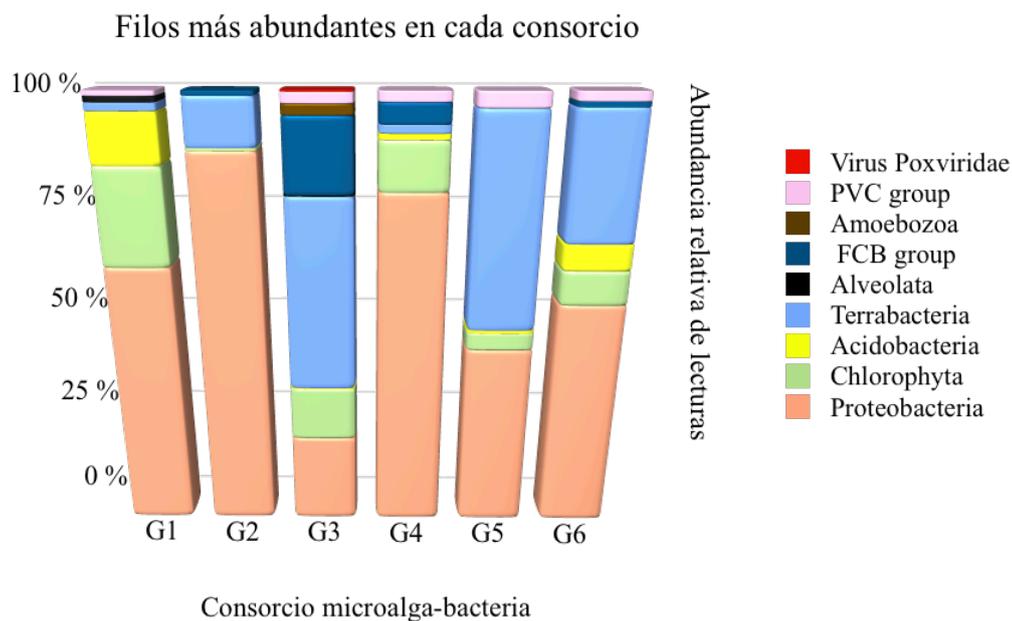
Altitud, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, pH, turbidez, origen, Cl, SO<sub>4</sub>, Ba, Mn, Zn, Ca, Mg, Na. Se muestra que para la Riqueza de los consorcios únicamente las variables de Isla y Sodio son significativas. Esto implica que todas las variables mencionadas pueden influir en la alfa diversidad.

**Tabla 5.-** Influencia de variables experimentales y ambientales en la beta diversidad

Variable	R <sup>2</sup>	Pr > F
<b>Variables Experimentales</b>		
Secuenciamiento	0,6694	0,081
Agua residual	0,0626	0,243
<b>Variables Ambientales</b>		
Isla	0.073	0.011
Origen	0.372	0.001
Altitud	0.073	0.016
Temperatura	0.372	0.001
DO	0.372	0.001
Conductividad	0.372	0.001
pH	0.372	0.001
Turbidez	0.372	0.001
Cl	0.372	0.001
F	0.145	0.001
SO <sub>4</sub>	0.289	0.001
Zn	0.372	0.001
Mg	0.372	0.001
Mn	0.372	0.001
Ca	0.372	0.001
Na	0.217	0.001
Ba	0.372	0.001
<b>Interacciones entre Variables</b>		
Isla - Altitud	0,072	0,006

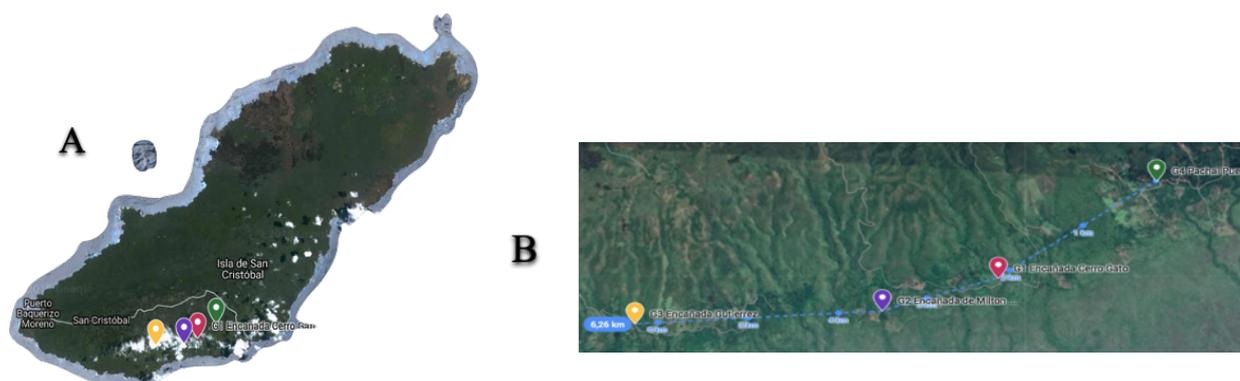
Las variables en amarillo son significativas (valor  $P < 0,05$ ) luego de correr la prueba Permanova en R, en base a la matriz de diversidad de Bray-Curtis, obtenida en el programa Simka.

## FIGURAS



**Figura 1.-** Comparación de los principales filos en los seis consorcios de Galápagos

El porcentaje de abundancia de cada filo se calculó en base al total de lecturas clasificadas, en todos los consorcios se representa >50% del total de lecturas clasificadas. Cada lectura de secuenciación se asigna a un taxón luego de comparar la lectura con la base de datos NCBI BLAST non-redundant protein “nr+euk” (Menzel, Lee, & Krogh, 2016).



**Figura 2.-** Mapa de origen de los consorcios G1, G2, G3 y G4 en la Isla San Cristóbal

A) Vista de la isla San Cristóbal y B) Zoom de localidades de donde se obtuvieron las muestras.



Bacterias Clasificadas en cada Consorcio

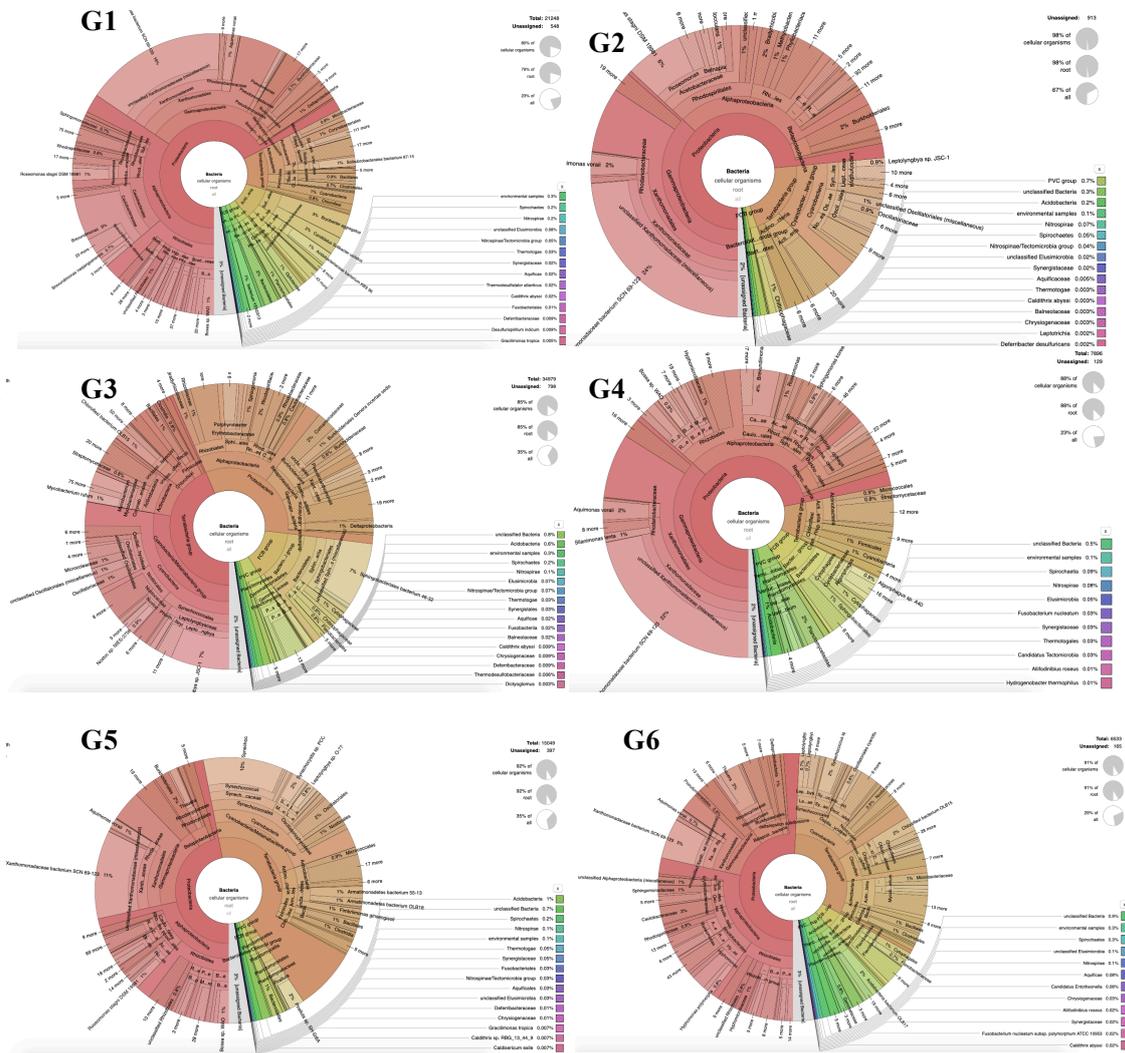


Figura 5.- Krona charts de Eucariotas en el Ensayo de Secuenciación 2

## ANEXOS

## ANEXO A: METADATA EMPLEADA PARA LOS ANÁLISIS DE ALFA Y BETA DIVERSIDAD

Sample ID	Sequencing	Island	Altitude	Temperature	Temperature	DO	DO Quality	Conductivity	Conductivity	pH	pH Quality	Turbidity	Turbidity Q
G1 E1	1	San Cristoba	180	23,27	Low	102,4	Low	101,3	Low	7,62	Neutral	14,2	High
G2 E1	1	San Cristoba	190	24,72	Low	94,9	Low	104,8	Low	7,45	Neutral	14,03	High
G3 E1	1	San Cristoba	179	23,44	Low	67,6	Low	49,7	Low	6,34	Acidic	15,87	High
G4 E1	1	San Cristoba	202	22,83	Low	88,7	Low	117,9	Low	7,08	Neutral	5,29	Low
G5 E1	1	Isabela	5	34,72	High	176,9	High	5840,4	High	8,98	Alkaline	0,92	Low
G6 E1	1	Isabela	10	33,77	High	272,9	High	3532,3	High	9,68	Alkaline	24,1	High
G1 E2	2	San Cristoba	180	23,27	Low	102,4	Low	101,3	Low	7,62	Neutral	14,2	High
G2 E2	2	San Cristoba	190	24,72	Low	94,9	Low	104,8	Low	7,45	Neutral	14,03	High
G3 E2	2	San Cristoba	179	23,44	Low	67,6	Low	49,7	Low	6,34	Acidic	15,87	High
G4 E2	2	San Cristoba	202	22,83	Low	88,7	Low	117,9	Low	7,08	Neutral	5,29	Low
G5 E2	2	Isabela	5	34,72	High	176,9	High	5840,4	High	8,98	Alkaline	0,92	Low
G6 E2	2	Isabela	10	33,77	High	272,9	High	3532,3	High	9,68	Alkaline	24,1	High
G1 E3	3	San Cristoba	180	23,27	Low	102,4	Low	101,3	Low	7,62	Neutral	14,2	High
G2 E3	3	San Cristoba	190	24,72	Low	94,9	Low	104,8	Low	7,45	Neutral	14,03	High
G3 E3	3	San Cristoba	179	23,44	Low	67,6	Low	49,7	Low	6,34	Acidic	15,87	High
G4 E3	3	San Cristoba	202	22,83	Low	88,7	Low	117,9	Low	7,08	Neutral	5,29	Low
G5 E3	3	Isabela	5	34,72	High	176,9	High	5840,4	High	8,98	Alkaline	0,92	Low
G6 E3	3	Isabela	10	33,77	High	272,9	High	3532,3	High	9,68	Alkaline	24,1	High

Origin	Cl	F	SO4	Waste Water	Ba	Mn	Zn	Ca	Mg	Na
Encanada Cerro Gato	449,5	0	3,3	1	23,86	5,89	16,43	4,03	5	7,32
Encanada Milton Aguas	114,1	0	4,3	1	26,23	7,27	25,31	6,12	1,52	5,6
Encanada Gutierrez	86,6	0	4,3	1	18,57	25,39	18,91	0,76	0,59	5,6
Pachai Puerto Chino	148,2	0	4,7	1	14,37	2,41	11,4	0,98	1	5,6
Poza de las Diablas	28988,2	0,3	96,9	1	60,71	3,82	8,9	26,72	25,83	417,34
El Chapin1	20254,8	0,7	56	1	47,34	2,1	32,85	30,86	27,1	389,88
Encanada Cerro Gato	449,5	0	3,3	2	23,86	5,89	16,43	4,03	5	7,32
Encanada Milton Aguas	114,1	0	4,3	2	26,23	7,27	25,31	6,12	1,52	5,6
Encanada Gutierrez	86,6	0	4,3	2	18,57	25,39	18,91	0,76	0,59	5,6
Pachai Puerto Chino	148,2	0	4,7	2	14,37	2,41	11,4	0,98	1	5,6
Poza de las Diablas	28988,2	0,3	96,9	2	60,71	3,82	8,9	26,72	25,83	417,34
El Chapin1	20254,8	0,7	56	2	47,34	2,1	32,85	30,86	27,1	389,88
Encanada Cerro Gato	449,5	0	3,3	2	23,86	5,89	16,43	4,03	5	7,32
Encanada Milton Aguas	114,1	0	4,3	2	26,23	7,27	25,31	6,12	1,52	5,6
Encanada Gutierrez	86,6	0	4,3	2	18,57	25,39	18,91	0,76	0,59	5,6
Pachai Puerto Chino	148,2	0	4,7	2	14,37	2,41	11,4	0,98	1	5,6
Poza de las Diablas	28988,2	0,3	96,9	2	60,71	3,82	8,9	26,72	25,83	417,34
El Chapin1	20254,8	0,7	56	2	47,34	2,1	32,85	30,86	27,1	389,88

**ANEXO B: ENSAYOS DE REMOCIÓN CON LOS CONSORCIOS MICROALGA-BACTERIA DE GALÁPAGOS**

Ensayos en Agua Residual Estéril						
Consortio	Amonio (%RE)	Fosfato (%RE)	DQO (%RE)	Nitrato (%RE)	Q (mg/Ld)	ChLt (mg/L)
G1	65,83	78,72	63,58	51,93	67,67	36,11
G1	68,40	78,72	67,78	50,51	67,67	54,78
G1	62,56	81,09	69,67	36,68	97,33	73,75
G2	57,71	60,45	66,17	28,45	83,33	50,16
G2	60,38	60,45	71,22	42,68	81,00	52,29
G2	56,22	75,49	73,48	19,42	78,00	50,82
G3	60,90	57,87	72,02	30,88	83,67	50,15
G3	78,26	58,09	72,64	29,74	102,00	50,17
G3	80,75	68,29	75,10	41,59	106,67	50,20
G4	61,40	58,79	69,06	31,99	101,33	48,55
G4	69,08	66,53	66,49	37,02	104,33	48,23
G4	63,68	50,35	73,89	34,79	87,33	48,01
G5	38,28	74,93	61,78	36,32	105,33	51,77
G5	71,28	76,72	60,05	37,81	91,00	52,79
G5	57,71	55,89	67,47	37,78	114,67	51,83
G6	78,91	65,34	76,58	25,92	148,67	73,11
G6	81,24	60,54	73,01	32,18	102,67	53,10
G6	81,33	60,56	68,08	32,10	82,00	52,92

Cada ensayo se realizó por triplicado. %RE significa eficiencia de remoción. Q (mg/Ld)

significa productividad celular y ChLt (mg/L) se refiere a la concentración total de clorofila.