

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis de la composición de consorcios microbianos de la región
Andina con capacidad de remediación de aguas residuales**

Naomi Daniela Mora Jaramillo

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

**Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales**

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Análisis de la composición de consorcios microbianos de la región
Andina con capacidad de remediación de aguas residuales**

Naomi Daniela Mora Jaramillo

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Juan José Guadalupe, MSc

Quito, 17 de diciembre de 2021

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Naomi Daniela Mora Jaramillo

Código: 00201667

Cédula de identidad: 0927529990

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 alga-bacteria nativos de la región Andina, que están adaptados a ambientes con grandes volúmenes de descarga de contaminantes, representan un gran potencial del uso de los mismos para el tratamiento de aguas residuales con un enfoque más sostenible. En el presente estudio, se analizó la dinámica de la composición y función microbiana del consorcio alga-bacteria obtenido de lagunas de la región Andina en Ecuador en tres time points de remoción de nutrientes (0.9 y 12 días). Los perfiles taxonómicos y funcionales de las comunidades microbianas presentes en el consorcio se obtuvieron a partir de los datos de la secuenciación por shotgun metagenomics mediante el uso de los softwares bioinformáticos. Los resultados de la clasificación taxonómica revelaron una predominancia de los filos bacterianos Pseudomonadota (63-79%) y Bacteroidota (9-27%), cuya dominancia en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) se relaciona a su rol en la degradación de la materia orgánica y ciclo de nutrientes. Así también, el filo eucariota más abundante correspondió a Chlorophyta (4-13%), cuya presencia en los controles oscuros se atribuyó al crecimiento heterótrofo presente en ciertas microalgas de este filo. El análisis de alfa diversidad utilizando el índice de Shannon (0,80-1,13) y Simpson (0,37-0,57) indican una baja diversidad en el consorcio, que puede estar atribuida a los patrones de dominancia de los filos antes mencionados. Finalmente, el análisis de los perfiles funcionales evidenció la presencia de rutas metabólicas necesarias en PTARs en todos los time points estudiados, relacionadas al metabolismo de aminoácidos, vitaminas, lípidos y ácidos grasos, nitrógeno, entre otros. A partir de esto, el presente estudio provee un análisis preliminar del potencial del uso de consorcios microbianos nativos de la región Andina en el tratamiento de aguas residuales.

Palabras clave: consorcio microbiano, aguas residuales, región Andina, perfiles taxonómicos, alfa diversidad, beta diversidad, perfiles funcionales.

ABSTRACT

The characterization of native algae-bacteria consortia in the Andean region, which are adapted to environments with large volumes of pollutant discharge, represent great potential for their use for wastewater treatment with a more sustainable approach. In the present study, the dynamics of the composition and microbial function of the alga-bacteria consortia obtained from lagoons of the Andean region in Ecuador were analyzed at three nutrient removal time points (0.9 and 12 days). The taxonomic and functional profiles of the microbial communities present in the consortia were obtained from the sequencing data by shotgun metagenomics using bioinformatics softwares. The results of the taxonomic classification revealed a predominance of the bacterial phyla Pseudomonadota (63-79%) and Bacteroidota (9-27%), whose dominance in wastewater treatment plants (WWTPs) is related to their role in the degradation of organic matter and nutrient cycles. Likewise, the most abundant eukaryotic phylum corresponded to Chlorophyta (4-13%), whose presence in the dark controls was attributed to the heterotrophic growth present in certain microalgae of this phylum. The analysis of alpha diversity using the Shannon (0,80-1,13) and Simpson index (0.37-0.57) indicate a low diversity in the consortium, which may be attributed to the dominance patterns of the phyla mentioned before. Finally, the analysis of the functional profiles showed the presence of necessary metabolic pathways in WWTPs in all the time points studied, related to the metabolism of amino acids, vitamins, lipids and fatty acids, nitrogen, among others. Based on this, the present study provides a preliminary analysis of the potential for the use of native microbial consortia from the Andean region in wastewater treatment.

Keywords: microbial consortium, wastewater, Andean region, taxonomic profiles, alpha diversity, beta diversity, functional profiles.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	10
1.1	Concepto y alcance de la biorremediación en el tratamiento de aguas residuales...	10
1.2	Uso de consorcios microbianos en la biorremediación de aguas residuales.....	11
1.3	Secuenciamiento Metagenómico	12
1.4	Tratamiento de aguas residuales en la región Andina de Ecuador	13
2.	METODOLOGÍA	14
2.1	Propagación de consorcios y recolección de muestras	14
2.2	Extracción de ADN total, cuantificación y electroforesis en gel.....	14
2.3	Secuenciamiento de consorcios con MinION de Oxford Nanopore.....	15
2.3.1	Preparación de librerías.....	15
2.3.2	Secuenciamiento en dispositivo MinION y Basecalling	15
2.4	Análisis Bioinformáticos	15
2.5	Alfa y beta diversidad	16
3.	RESULTADOS.....	17
3.1	Secuenciamiento metagenómico y control de calidad.....	17
3.2	Perfiles taxonómicos.....	17
3.3	Alfa diversidad.....	18
3.4	Beta diversidad.....	19
3.5	Perfiles funcionales.....	20
4.	DISCUSIÓN	21
5.	CONCLUSIÓN.....	25
6.	TABLAS	26
7.	FIGURAS	28
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1. Información obtenida de los secuenciamientos del consorcio alga-bacteria de la región Andina en los distintos <i>time points</i> estudiados.....	26
Tabla #2. Índices de alfa diversidad calculados para los diferentes tiempos estudiados.....	26
Tabla #3. Índices de Bray-Curtis para el análisis de beta diversidad entre los <i>time points</i> analizados.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1. Clasificación taxonómica de los principales filos presentes en el consorcio alga bacteria de la Zona Andina en los distintos <i>time points</i>	28
Figura #2. Heatmap de beta diversidad (Bray-Curtis) comparando las diferencias en la composición de las comunidades microbiana entre los diferentes puntos de remoción de contaminantes.	28
Figura #3. Principales rutas metabólicas compartidas por los consorcios en los distintos <i>time points</i> analizados.....	29
Figura #4. Principales rutas metabólicas involucradas en procesos de degradación de contaminantes presentes en el consorcio analizado en los diferentes <i>time points</i>	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Concepto y alcance de la biorremediación en el tratamiento de aguas residuales

El aumento exponencial de las poblaciones humanas, así como la cantidad y calidad de los residuos producidos y vertidos han generado un incremento evidente en la contaminación de cuerpos de agua, los cuales se convierten en aguas residuales (Ojha, Karn, Abbas, & Bhugra, 2021). Esta problemática es de gran preocupación en todo el mundo y su estudio puede ser dividido en tres categorías principales de acuerdo con la composición de las mismas, que son: contaminación por compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos (como metales pesados) y microorganismos. Los desechos en estos cuerpos de agua contienen materiales orgánicos que incluyen productos químicos peligrosos, como pesticidas, detergentes, disolventes, fenoles, entre otros (Sidhu, Vikram, & Pinnaka, 2017), que representan posibles peligros para la salud y, por lo tanto, deben estar sujetos a tratamientos para reducir la carga de patógenos y compuestos tóxicos.

La biorremediación es una técnica de remoción de gran éxito e interés para eliminar o reducir desechos tóxicos provenientes de aguas residuales. La biorremediación está involucrada en la degradación, remoción, concentración o recuperación de diversos desechos químicos y materiales físicos del entorno a través de la acción integral de los microorganismos (Shah & Shah, 2020). Además, es utilizada frecuentemente en el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales debido a sus bajos costos operativos y su alta eficiencia para la remoción de diversos tipos de materia orgánica y nutrientes (Ye & Zhang, 2013).

Se ha demostrado que la biorremediación o degradación biológica presenta ventajas sobre métodos químicos (Sharma, 2020). Los procesos convencionales como precipitación, ósmosis inversa, adsorción con carbón activado y procesos redox han sido utilizados de manera poco

efectiva debido a los altos costos de operación y la liberación, en algunas instancias, de subproductos tóxicos en el agua durante el proceso de tratamiento (Coelho, y otros, 2015). En comparación, la actividad biológica se ha evidenciado incluso cuando los microorganismos están presentes en soluciones muy diluidas (Sanchez, 2015).

1.2 Uso de consorcios microbianos en la biorremediación de aguas residuales

A partir de lo anterior, el uso de microorganismos nativos, que son un grupo de microorganismos inherentes de ambientes específicos, ha demostrado ser un enfoque exitoso para el tratamiento de aguas residuales (Saxena & Bharagava, 2016). Esto se debe a que estos microorganismos están adaptados a ambientes con grandes volúmenes de compuestos orgánicos que son utilizados como donadores de electrones, provocando un aumento del metabolismo microbiano (Araric, y otros, 2015). Adicionalmente, para reducir los *inputs* de energía, por el suministro constante de fuentes de carbono, en los últimos años se han explorado estrategias de biorremediación basadas en la relación sinérgica entre microorganismos fotosintéticos y heterótrofos, conocida como consorcios microbianos (Shetty, y otros, 2019).

Los consorcios microbianos han demostrado ser un enfoque para el tratamiento de aguas residuales más sostenible tanto en términos de contaminantes removidos, como de rentabilidad (Zhang, y otros, 2020). Esto se logra a través de las interacciones de las comunidades microbianas en el consorcio, en donde la composición de microalgas-cianobacterias proporciona el oxígeno, a través de su actividad fotosintética a las bacterias heterótrofas del consorcio, las cuales se encargan de la degradación de la materia orgánica, liberando como productos de la reacción CO_2 y nutrientes minerales que a su vez son utilizados por las microalgas cuando se exponen a la luz (Congestri, y otros, 2020), resultando en una mayor eficiencia de eliminación de contaminantes (Saxena & Bharagava, 2016). Siendo así que, la respuesta de consorcios alga-bacteria en la remoción de contaminantes, en la mayoría de casos,

depende más de la composición de la comunidad y las relaciones especie-especie que se desarrollan, que el nivel de contaminación existente (Gaikwad, Wate, Ramteke, & Kunal, 2015). Es por esto que, la integración de la ecología teórica en el diseño y operación de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) es importante para lograr una mejor predicción de las posibles variaciones en la estructura y función de las comunidades microbianas presentes, en respuesta a los cambios ambientales o condiciones de operación en bioreactores (Sidhu, Vikram, & Pinnaka, 2017).

1.3 Secuenciamiento Metagenómico

Debido a la diferente susceptibilidad de las bacterias al crecimiento en medios microbiológicos y a la baja tasa de bacterias cultivables (alrededor del 1%), el estudio de la dinámica de comunidades microbianas representa un gran desafío (Bodor, y otros, 2020). No obstante, durante la última década varias tecnologías han sido desarrolladas con el objetivo de comprender esta problemática, incluido el secuenciamiento de nueva generación (NGS) (Zhou, y otros, 2015). NGS abarca una gran variedad de tecnologías de secuenciamiento de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN, de alto rendimiento (Garner, y otros, 2021). Una de ellas es el secuenciamiento metagenómico, también referido como *shotgun metagenomics*. Este es el enfoque más utilizado para la caracterización de comunidades microbianas y sus capacidades funcionales en distintos cuerpos de agua (Coughlan, Cotter, Hill, & Alvarez-Ordóñez, 2015). Dispositivos como el MinION desarrollado por Oxford Nanopore Tehnology (ONT), han sido utilizados para llevar a cabo este tipo de secuenciamiento (ONT, 2021). El MinION utiliza nanoporos para identificar nucleótidos individuales, midiendo el cambio en la conductividad eléctrica cuando las moléculas de ADN pasan a través de este. Este procedimiento genera lecturas de longitudes de más de 100 kb a un costo comparativamente bajo y a una alta velocidad (ONT, 2021) (Sevim, y otros, 2019).

1.4 Tratamiento de aguas residuales en la región Andina de Ecuador

Es evidente entonces la necesidad de entender la dinámica microbiana de estos consorcios para poder aplicarlos de manera eficiente en el tratamiento de aguas residuales, principalmente en países como Ecuador, en donde se estima que el 44.2% de los efluentes domésticos e industriales son descargados al ambiente sin ningún tratamiento (INEC, 2016). Esta problemática es particularmente importante en la región Andina, ya que de aquí nacen las vertientes que distribuyen al país de sus recursos hídricos (Cabrera, Garcés, & Paredes, 2010). La exposición de las fuentes de agua de esta región a actividades antropogénicas, afectadas principalmente por los efluentes de las industrias química y petroquímica (hidrocarburos), explotaciones mineras y metalúrgica (sustancias químicas y metales pesados), textil (cromo) e industrias de alimentos y bebidas (compuestos orgánicos), deterioran la calidad del agua (Ministerio del Ambiente, 2017). Esto afecta principalmente a las poblaciones que no cuentan con abastecimiento de agua potable y utilizan estas vertientes para su consumo directo. Por lo tanto, la falta de tratamiento de aguas residuales en esta región no solo posa una amenaza ambiental, sino que también representa un riesgo para la salud de sus habitantes (García, 2018).

A partir de lo expuesto anteriormente, el presente estudio tiene como objetivo determinar la estructura y diversidad de comunidades microbianas, así como también identificar funciones metabólicas claves, presentes en consorcios alga-bacteria obtenidos de muestras de lagunas de la zona Andina en Ecuador en distintas etapas de ensayos de remoción (*time points*). A partir de este estudio, se espera contribuir a una comprensión más completa de la estructura de la comunidad microbiana de consorcios alga-bacteria presentes en ecosistemas acuáticos de la región Andina en Ecuador, para así lograr una mejor aplicación del tratamiento de aguas residuales en el país, mejorando el rendimiento de eliminación de contaminantes y siendo esta una técnica más accesible en el contexto económico de la región.

2. METODOLOGÍA

2.1 Propagación de consorcios y recolección de muestras

Las muestras de los consorcios obtenidas de la zona Andina se propagaron en agua residual sintética en biorreactores del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la USFQ (LIA-USFQ). Aquí, cada uno de los distintos ensayos de remoción se realizó incubando los tratamientos con agitación constante y en donde se establecieron fotoperiodos de 12 horas de luz (12:12). Además, para la determinación del efecto de las algas en la remoción de nutrientes, se utilizaron controles oscuros, que al estar en ausencia de luz, se esperaba que se inhiba el crecimiento de microorganismos fotosintéticos del consorcio, al no poder estos llevar a cabo este proceso de manera eficiente. A partir de los estudios preliminares en el LIA-USFQ, se definieron los *time points* (0, 9 y 12 días), correspondientes al periodo en el cual se observó remoción de nutrientes en los bioensayos. Luego, se procedió a recolectar las muestras para ser procesadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Para ello se tomaron los matraces Erlenmeyer del agitador y, evitando la sedimentación de los consorcios, se extrajo un inóculo de 15ml.

2.2 Extracción de ADN total, cuantificación y electroforesis en gel.

Para obtener ADN total genómico de las muestras ambientales de los consorcios alga-bacteria, se vertió en tubos Falcon el contenido del inóculo, el cual fue centrifugado y se descartó el líquido para concentrar la biomasa de las muestras. A continuación, se utilizó nitrógeno líquido junto con procesos de trituración y maceración para promover la lisis celular. Posteriormente se utilizó el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, 2017), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una vez extraído el ADN, la calidad y concentración del material genético extraído fue analizada utilizando el fluorómetro Qubit™ 4 (Thermo Fisher Scientific,

2018). Así también, la presencia de ADN integral en las muestras se confirmó a través de electroforesis en geles de agarosa preparados al 1.5%.

2.3 Secuenciamiento de consorcios con MinION de Oxford Nanopore

2.3.1 Preparación de librerías.

Previo a la preparación de las librerías, se realizó la purificación del ADN con perlas magnéticas AMPureXP (Beckman Coulter, 2021) utilizando un ratio 1.8X. Las concentraciones iniciales de ADN genómico, medidas mediante el Qubit™ dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, 2020), oscilaron entre 800-1000 ng por muestra analizada. A partir de lo anterior, se procedió a realizar la preparación de librerías utilizando el protocolo de Oxford Nanopore para el Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104) (ONT, 2019).

2.3.2 Secuenciamiento en dispositivo MinION y Basecalling

El secuenciamiento del consorcio alga-bacteria se realizó utilizando el dispositivo MinION (ONT, 2021) en donde se tomó en cuenta el protocolo antes mencionado para la preparación de la celda de flujo (ONT, 2019). Posteriormente, se inició el secuenciamiento después de cargar las librerías (12 µl). Las corridas de secuenciación en el MinION se establecieron de acuerdo con el estado de poros activos en las celdas de flujo. Siendo así que, los tiempos de corrida fueron de 23, 14 y 18 horas para los *time points* 0, 9 y 12 respectivamente . Posterior a este tiempo, a los archivos de datos resultantes en formato .fast5, se les realizó el Basecalling con GUPPY Version 3.1.5+781ed57 (ONT, 2019) incluido en el software de Oxford Nanopore Technologies (ONT), obteniendo como resultado archivos en formato .fastq.

2.4 Análisis Bioinformáticos

Para el análisis de las secuencias de interés, se realizó el *demultiplexing*, que requirió del reconocimiento de los barcodes en ambos extremos de las lecturas utilizando Porechop v0.2.4

(Wick, Judd, Gorrie, & Holt, 2017), a partir del cual tanto los barcodes como los adaptadores fueron removidos. La calidad de lectura se analizó utilizando Nanoplot v1.0.0 (De Coster, D'Hert, Schultz, & Cruets, 2018). Posteriormente, para el ensamblaje de los metagenomas secuenciados, se utilizó el programa Flye v2.8.3 (Kolmogorov, y otros, 2020), el cual utiliza las secuencias crudas (.fastq) para realizar el ensamblaje de novo de las mismas.

Para la asignación taxonómica se utilizó el servidor web del programa Kaiju (Menzel, Lee, & Krogh, 2016), en donde se ingresaron las secuencias .fastq comprimidas en formato .zip. Los resultados del programa utilizando la base de datos NCBI BLAST nr+euk, permitió identificar los principales tipos de microorganismos que conforman los consorcios. Por último, se utilizó el programa SqueezeMeta v1.4.0 (Tamames & Puente-Sánchez, 2019) para obtener datos de los perfiles funcionales de los consorcios en los diferentes *time points*, y la significancia estadística de los datos, fue analizada con la prueba Kruskal-Wallis.

2.5 Alfa y beta diversidad

La abundancia y distribución a nivel de filo de los principales microorganismos presentes en las muestras de consorcios para los distintos ensayos de remoción fueron visualizados utilizando un gráfico de columnas a través del software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018) . La evaluación de la alfa diversidad se realizó utilizando los índices de diversidad de Shannon y Simpson para las muestras tanto de los controles como de los tratamientos en los diferentes *time points*. Los análisis fueron realizados utilizando el paquete Vegan versión 2.5-7 (Oksanen, y otros, 2020) del software R Core Team (R Core Team, 2020). Por otro lado, para el análisis de la beta diversidad entre los puntos de estudio se utilizó el índice de Bray-Curtis . La evaluación de los resultados se realizó mediante gráficos Heatmap obtenidos utilizando el software Simka v3.0 (Benoit, y otros, 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Secuenciamiento metagenómico y control de calidad

Se realizaron en total 3 ensayos de secuenciamiento, correspondientes a cada uno de los *time points* establecidos (0, 9 y 12) del consorcio correspondientes a la Zona Andina (ZA). En la Tabla #1 se presentan los resultados obtenidos después del *demultiplexing*. En el *time point* cero (T0), se recuperaron 2'032,097 lecturas, con una calidad media de 11,1. En la corrida del *time point* 9 (T9) se obtuvo un total de 195,477 lecturas correspondientes al tratamiento y 320,367 pertenecientes al control oscuro, con calidades medias de 11,1 y 11,2 respectivamente. Finalmente, en la corrida del *time point* 12 (T12) se obtuvo un total de 170,942 lecturas para el tratamiento y 89,839 lecturas en el control oscuro con calidades medias de 10,6 y 10,7 respectivamente.

3.2 Perfiles taxonómicos

Los resultados de los perfiles taxonómicos obtenidos a través de la comparación de las abundancias relativas de los principales filos clasificados a través de la plataforma Kaiju, muestran que los tres filos más dominantes entre los distintos *time points* estudiados fueron: Proteobacteria (recientemente renombrado como Pseudomonadota) (NCBI, 2021), Bacteroidetes (renombrado Bacteroidota) (NCBI, 2021) y Chlorophyta (Figura #1). En todas las muestras estudiadas, Pseudomonadota fue el filo de bacterias más común con una abundancia relativa correspondiente a un rango de 63-79%, en donde se evidencia que su abundancia se reduce en los controles oscuros. La abundancia de Bacteroidota en los *time points* analizados se estableció en un rango de 9-27%, con un incremento evidente desde el tiempo cero, con una abundancia relativa del 9%, al tiempo 9, con abundancia de 16% en el tratamiento y 27% en el control oscuro. Sin embargo, en el T12 se evidencia una disminución

de la abundancia tanto en el tratamiento como en el control comparado con el T9. Por otro lado, Chlorophyta fue el filo de Eucariota más común en las muestras analizadas, con abundancias relativas en los distintos puntos de remoción que se encontraban en un rango de 7-13%, en donde la mayor abundancia se evidenció en el tratamiento del T9, mientras que los valores más bajos, de 6 y 4%, se encontraron en los controles oscuros del T9 y T12.

3.3 Alfa diversidad

Debido a la importancia de tomar en cuenta los factores de riqueza y heterogeneidad para determinar la diversidad de microorganismos presentes en los diferentes *time points*, la diversidad de los principales filos clasificados en las muestras fue evaluada utilizando el índice de Shannon y de Simpson. Si bien ambos índices contemplan las abundancias relativas de los diferentes filos, el índice de Shannon da un peso mayor a la riqueza de estos y toma en cuenta también el grado medio de incertidumbre en la predicción de dónde pertenecerán los filos elegidos al azar (Morris, y otros, 2014). Los valores de este índice oscilan entre 0-5, en donde el valor incrementa al mismo tiempo que incrementa el número de especies y a medida que la distribución de individuos se vuelve más uniforme (Lu, Wagner, & Chen , 2007). Por otra parte, el índice de Simpson considera la dominancia de ciertas especies en una muestra, más que la riqueza de estos en sus medidas, reflejando así la probabilidad de que dos individuos pertenezcan al mismo filo al ser seleccionados al azar (Kumar, Bhardwaj, Kumar, & Sharma, 2019).

A partir de esto, en la Tabla #2 se muestra que, para el índice de diversidad de Shannon se obtuvieron valores de 1,01, 1,06 , 1,13, 0,80 y 0,89 para el T0, el tratamiento de T9, control oscuro de T9, tratamiento T12 y control oscuro T12 respectivamente. A partir de los datos obtenidos, es evidente que la muestra con mayor diversidad corresponde a la del control del T9, mientras que aquella con un índice menor de diversidad pertenece al tratamiento de T12.

Con respecto al índice Simpson, se obtuvieron valores de 0,44 para el T0, 0,52 en el tratamiento del T9, 0,57 para el control del T9, 0,37 para el tratamiento de T12 y 0,44 para el control oscuro del T12. Aquí, se hace evidente que el *time point* con mayor dominancia de especies es también correspondiente al control de T9.

Además, para determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Al analizar los datos obtenidos tanto para el índice de Shannon como para el índice de Simpson con esta prueba, se obtuvo que con un valor $P= 0.41$ ($P > 0.05$), las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.

3.4 Beta diversidad

Los resultados para la diversidad entre las muestras analizadas (beta diversidad) se muestran en la Tabla #3 en donde se presentan los índices de Bray-Curtis, para la cuantificación de las diferencias entre los *time points* estudiados en base a las diferencias en composición y abundancia de las especies presentes en los filos más abundantes. En base a este índice se obtuvo que las comparaciones de los consorcios en los mismos *time points* resultaban en un índice de Bray-Curtis de 0. Por otro lado, las disimilitudes más evidentes, se presentaron en la comparación entre el T0 y el tratamiento y control oscuro del T12 con valores del índice de Bray-Curtis de 0,98 y 0,97 respectivamente, indicando una composición muy poco similar entre los mismos. Así también se observan disimilitudes grandes al realizar la comparación entre el T9 y el T12, en donde los valores para los índices tanto entre tratamientos como de controles oscuros son mayores a 0,84. Además, los índices para las comparaciones entre los tratamientos y controles oscuros en los mismos *time points* también presentaron diferencias, siendo así que en el T9 se obtuvo un valor de 0,76 para dicha comparación, mientras que en el T12 este valor correspondió a 0,71. Estas comparaciones se presentan de igual forma en el Heatmap para el índice de Bray-Curtis entre *time points* estudiados (Figura #2).

3.5 Perfiles funcionales

Al realizar el ensamblaje de genomas completos obtenidos a partir de metagenomas (MAGs) utilizando SqueezeMeta, se encontraron entre 61 a 174 categorías funcionales claves atribuidas a los microorganismos presentes en los consorcio alga-bacteria estudiados. Se evidenció la presencia de genes compartidos ampliamente involucrados en el metabolismo de aminoácidos, vitaminas, lípidos y ácidos grasos, nitrógeno, entre otros (Figura #3). De las rutas metabólicas compartidas entre los *time points* analizados, se seleccionaron aquellas involucradas en procesos de biorremediación para su posterior análisis, en donde se obtuvo un total de 16 rutas metabólicas de interés. A partir de esto, se encontraron genes que codifican para rutas metabólicas involucradas en procesos de degradación de compuestos aromáticos y derivados como la degradación de gamma-hexaclorociclohexano, estireno, bifeniles, benzoatos, 1- y 2-metilnaftaleno y 1,4-diclorobenceno, son más abundantes en el control oscuro del T9, en donde además se evidenció la presencia de genes que codifican para la degradación del fluoreno los cuales no se encuentran en los demás *time points* estudiados. Así mismo en el T0 se identificó la presencia de genes únicos que codifican para la degradación de atrazina. Así también, en el tratamiento del T9 se encontraron genes únicos que codifican para la degradación de bifenol a, naftaleno y antraceno y genes más abundantes en rutas de degradación de fluorobenzoato y carbazol. por último, la ruta más abundante observada para el control oscuro del T12 fue la de degradación de 1,2-dicloroetano.

Se realizó además una prueba de Kruskal-Wallis para determinar la significancia estadística de las diferencias obtenidas para los perfiles funcionales en los distintos *time points*. Aquí, se obtuvo que con un valor P de 0.02 ($P < 0.05$) las variaciones observadas, son estadísticamente significativas.

4. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron que, en primer lugar, utilizando métodos de secuenciamiento de lecturas largas con la tecnología de ONT (ONT, 2021), se obtuvieron calidades medias entre 10,6-11,2, los cuales indican una precisión de asignación de bases mayor al 90% (Sathyanarayanan, y otros, 2018). Si bien una práctica común es filtrar las bases con calidades por debajo de 20 (precisión del 99%), los estudios donde se utiliza este umbral utilizan genes marcadores como el 16S rRNA, resultando en una mayor profundidad del secuenciamiento (Mattson, y otros, 2021). No obstante, el uso de estos genes marcadores representa también sesgos en el estudio de comunidades microbianas, cuyas fuentes incluyen: la amplificación por PCR, los artefactos del secuenciamiento, el número de copias de ADN, entre otros (Brooks, y otros, 2015). Adicionalmente, el estudio con genes marcadores limita el análisis de microorganismos poco estudiados, por lo cual el uso de *shotgun metagenomics* en el presente análisis permitió superar estas limitaciones.

Con respecto al análisis taxonómico y en concordancia con estudios previos (Zhang, y otros, 2020; Eze, y otros, 2021; Elul, y otros, 2020), se evidenció en el presente estudio, a las bacterias como el tipo de microorganismo más prevalentes en las muestras para los distintos *time points* estudiados, comprendiendo entre el 82-93% de los microorganismos clasificados. En estudios similares, donde se analizó la diversidad bacteriana en aguas residuales domésticas, se encontraron abundancias de bacterias que oscilan entre 95-98%, con variaciones correspondientes a la zona muestreo (Yasir, 2021). Dentro de las bacterias, los filos más abundantes correspondieron a Pseudomonadota, seguido de Bacteroidota y en menor abundancia Cyanobacterias, Actinobacterias (renombrado como Actinomycetota) y Firmicutes (Bacillota) (NCBI, 2021). Recientemente, un estudio de la diversidad global de las comunidades bacterianas en plantas de tratamiento de aguas residuales demostró que el filo

Pseudomonadota posee un rol importante en la degradación de la materia orgánica y ciclo de nutrientes en estos cuerpos de agua (Wu, y otros, 2019), lo cual explicaría la alta abundancia del mismo en la muestra analizada.

Además, la presencia de bacterias del filo Bacteroidota y sus interacciones con microorganismos del filo Pseudomonadota juegan un rol importante en aguas residuales (Atashgahi, y otros, 2015). Siendo así que, se ha evidenciado la formación de *clusters* de microorganismos anaerobios (facultativos y obligados) del filo Bacteroidota presentes en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales donde descomponen compuestos orgánicos complejos (Niestepski, Monika, Stawomir, Korzeniewska, & Osínska, 2020). De esta forma, la disminución de microorganismos fotosintéticos en los controles oscuros, como resultado de la ausencia de luz en los mismos, puede influir en la disponibilidad de oxígeno para los organismos heterótrofos del consorcio, ya que existe menor disponibilidad del mismo, en comparación con el tratamiento. Esta situación favorece entonces el crecimiento de microorganismos del filo Bacteroidota, mientras que se reduce al mismo tiempo la abundancia de organismos aerobios, como los son Pseudomonadotas.

Con respecto a las algas, el filo de eucariotas más abundante encontrado en las muestras analizadas corresponde a Chlorophyta, que está conformada en su mayoría por microorganismos pertenecientes al género *Chlorella* (71-80%) y cuya mayor abundancia en comparación con los controles oscuros en los tratamientos del T9 (13%) y T12 (7%) fue la esperada, ya que son organismos fotosintéticos que necesitan de la luz para crecer. No obstante, un estudio en el que se analizó la tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en aguas residuales suplementadas con carbono orgánico, demostró que estas algas pueden presentar crecimiento heterotrófico, con independencia de luz (Perez-Garcia, Bashan, & Puente, 2011). Sin embargo, las tasas de crecimiento de este último son más lentas, cómo se pudo comprobar en el presente estudio.

Para el análisis de la diversidad del consorcio estudiado, los resultados obtenidos para el índice de Shannon revelaron valores de entre 1,01 y 1,13. Valores de este índice de entre 1,5-3,5 sugieren una diversidad moderada alta (Li, y otros, 2021). Por lo tanto, el consorcio analizado presenta baja diversidad en los diferentes *time points*. Al comparar los resultados obtenidos con los presentados en la literatura, se encontró resultados conflictivos, ya que, si bien algunos estudios reportan un aumento en la diversidad después de tratamientos (Shahraki, Chaganti, & Heath, 2021), otros reportan menores diversidades como en el presente estudio (Numberger, y otros., 2019). Esto se debe principalmente a que el uso de datos obtenidos del secuenciamiento pueden resultar en un muestreo incompleto, ya que las secuencias de todos los microorganismos presentes no pueden medirse como resultado de diferencias en la profundidad del secuenciamiento (Wagner, y otros, 2018). Incluso, estos índices pueden verse sesgados negativamente por el parámetro del ambiente, en donde las bases de datos contienen más información de ambientes más estudiados, resultando en bajos porcentajes de clasificación (Willis, 2019) (Li, y otros, 2017). Por otro lado, al comparar los índices de diversidad de Simpson obtenidos en el presente estudio con los resultados del análisis en el tiempo de una PTAR en España (de Celis, y otros, 2020), se evidenció que en ambos no se observan diferencias significativas en los *time points* de estudio, lo cual puede estar determinado por los patrones de dominancia de los filos Pseudomonadotas y Bacteroidota encontrados en PTARs a nivel global (Wu, y otros, 2019).

Con respecto a los índices de beta diversidad de Bray-Curtis calculados, se encontraron valores que oscilan entre 0,71-0,98, en donde mayores distancias fueron observadas entre el T0 y el T12. Estos resultados van de acuerdo con la teoría de sucesión comunitaria, que se refiere al ajuste de la estructura la comunidad microbiana en respuesta a factores ecológicos (Qi, y otros, 2021). A partir de esto, en el presente estudio, las relaciones dentro del consorcio se vieron influenciadas por factores como la disponibilidad de sustratos, oxígeno disuelto (OD)

y luz (Ayre, Mickan, Jenkins, & Moheimani, 2021). Siendo así que, debido a que para el T12 la concentración de nutrientes se había reducido considerablemente en los bioensayos, se esperaba que la estructura de la comunidad cambie desde el inicio del bioensayo (T0) hasta el final (T12) como se evidenció en el presente estudio.

El análisis de los perfiles funcionales de las muestras analizadas reveló un considerable número de ortologías, en donde se analizaron las rutas metabólicas presentes relacionadas con metabolismo de ciertos contaminantes y degradación de compuestos aromáticos y derivados. De esta forma, se evidenció que, las asignaciones más abundantes están presentes en el control oscuro del T9. Sin embargo, la presencia de rutas para el metabolismo de xenobióticos, vitaminas, aminoácidos, nitrógeno y lípidos y ácidos grasos se presentan en los tratamientos y controles oscuros de los 3 *time points*. De estas, principalmente las dos últimas rutas mencionadas, se han implicado en actividades metabólicas esenciales en comunidades microbianas, y son necesarios en plantas de tratamiento de aguas residuales (Deng, y *otros.*, 2020). Demostrando así, el potencial del consorcio alga-bacteria analizado como técnica de biorremediación en el tratamiento de aguas residuales.

Además, al analizar las diferentes rutas de degradación de compuestos aromáticos y derivados, se observa una relación de estas con los tipos de contaminantes presentes en las zonas de extracción de la zona Andina, afectadas principalmente por efluentes de procesos industriales, agricultura y/o procesos de transformación o explotación, como la minería, hidrocarburos, metalúrgicos, entre otros (Guanquiza & Antúnez, 2019). Siendo así que, rutas de degradación de diclorobenceno, benzoato, metilnaftaleno y estireno, que se ven enriquecidas en los controles oscuros, sugieren una degradación de estas bajo condiciones anaerobias, ya que se conoce que, durante estas condiciones, la respuesta de los consorcios microbianos a estos compuestos antropogénicos conduce a diferentes tipos de asociaciones microbianas (Sidhu, Vikram, & Pinnaka, 2017).

5. CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente estudio provee un análisis preliminar del potencial uso de consorcios alga-bacteria nativos de la Zona Andina en el tratamiento de aguas residuales, a través del análisis comparativo de la taxonomía y potencial funcional de 3 time points distintos en ensayos de remoción. Aquí, la caracterización taxonómica reveló una predominancia principalmente de los filos Pseudomonadota, Bacteroidota y Chlorophyta. A partir de estos, se obtuvo que las abundancias de los mismos varían de acuerdo al tiempo y el control oscuro influyendo así en la estructura de las comunidades microbianas estudiadas. Los análisis de alfa diversidad demostraron que si bien la diversidad de microorganismos es baja en términos de riqueza de especies (índice de Shannon), la dominancia de ciertos filos (índice de Simpson) sugiere un efecto predominante de los mismos en la remoción de nutrientes. A su vez, los resultados de beta diversidad revelaron diferencias comparables entre las composiciones de comunidades microbianas en los time points estudiados, lo que sugiere un cambio en la dinámica microbiana influenciado tanto por la disponibilidad de sustratos como por las condiciones de estudio (tratamiento o control oscuro). Con respecto al análisis de genes funcionales, es evidente que tanto los tratamientos como los controles oscuros en los 3 time points cuentan con genes que codifican para rutas metabólicas necesarias en plantas de tratamiento residuales, asociadas al mismo tiempo a la dinámica microbiana que se observó.

Por lo tanto, futuros estudios deberían analizar el potencial de los tratamientos y controles oscuros en distintas condiciones en los biorreactores, así como también analizar la capacidad del consorcio para la degradación de contaminantes aromáticos presentes en los cuerpos de agua de la Zona Andina. Por último, se recomienda también realizar análisis a nivel de género y especie de microorganismos presentes, para una mejor comprensión del efecto de estos en la dinámica del consorcio estudiado.

6. TABLAS

Tabla #1. Información obtenida de los secuenciamientos del consorcio alga-bacteria de la región Andina en los distintos *time points* estudiados

Parámetro	T0	T9_Trat	T9_DC	T12_Trat	T12_DC
Número de lecturas recuperadas	2 032 097	195 477	320 367	170 942	89 839
Tiempo de secuenciamiento (horas)	23	14	14	18	18
Calidad media de lecturas	11,1	11,1	11,2	10,6	10,7
Longitud media de lecturas	823,0	3147,2	4723,0	1329,1	2120,1

En la presente tabla se muestran los diferentes parámetros obtenidos del secuenciamiento del consorcio de la región Andina en los distintos *time points* estudiados. En donde T0 corresponde al *time point* cero, T9_Trat se refiere a los resultados del tratamiento del *time point* del día 9, T9_DC corresponde al control oscuro del *time point* del día 9 y T12_Trat y T12_DC corresponden al tratamiento y control oscuro del *time point* del día 12 respectivamente. Los resultados aquí presentados son los productos del análisis en Nanoplot v1.0.0 (De Coster, D'Hert, Schultz, & Cruets, 2018).

Tabla #2. Índices de alfa diversidad calculados para los diferentes tiempos estudiados

<i>Time point</i>	Índice Shannon	Índice Simpson
T0	1,01	0,44
T9_Trat	1,06	0,52
T9_DC	1,13	0,57
T12_Trat	0,80	0,37
T12_DC	0,89	0,44

En la Tabla #2 se muestran los índices de diversidad de Shanon y Simpson para el *time point* 0 (T0), tratamiento y control oscuro del *time point* 9, T9_Trat y T9_DC respectivamente, y para el tratamiento y control oscuro del *time point* 12, T12_Trat y T12_DC respectivamente. Los índices aquí mostrados, fueron calculados a partir del paquete Vegan versión 2.5-7 (Oksanen, y otros, 2020) del software R (R Core Team, 2020).

Tabla #3. Índices de Bray-Curtis para el análisis de beta diversidad entre los *time points* analizados.

<i>Time point</i>	TP0	TP9_DC	TP9_tratamiento	TP12_DC	TP12_tratamiento
TP0	0,00	0,92	0,88	0,97	0,98
TP9_DC	0,92	0,00	0,76	0,93	0,96
TP9_tratamiento	0,88	0,76	0,00	0,84	0,90
TP12_DC	0,97	0,93	0,84	0,00	0,71
TP12_tratamiento	0,98	0,96	0,90	0,71	0,00

En la presente tabla se muestran los índices de disimilitud de Bray-Curtis, donde 0 corresponde a las comparaciones que no presentan diferencia de composición y valores cercanos a 1 corresponden a aquellas comparaciones con mayores disimilitudes de composición. T0: *time point* 0; T9_DC: control oscuro del *time point* 9 ; T9_Trat : tratamiento *time point* 9; T12_DC: control oscuro del *time point* 12 ; T12_Trat : tratamiento *time point* 12.

7. FIGURAS

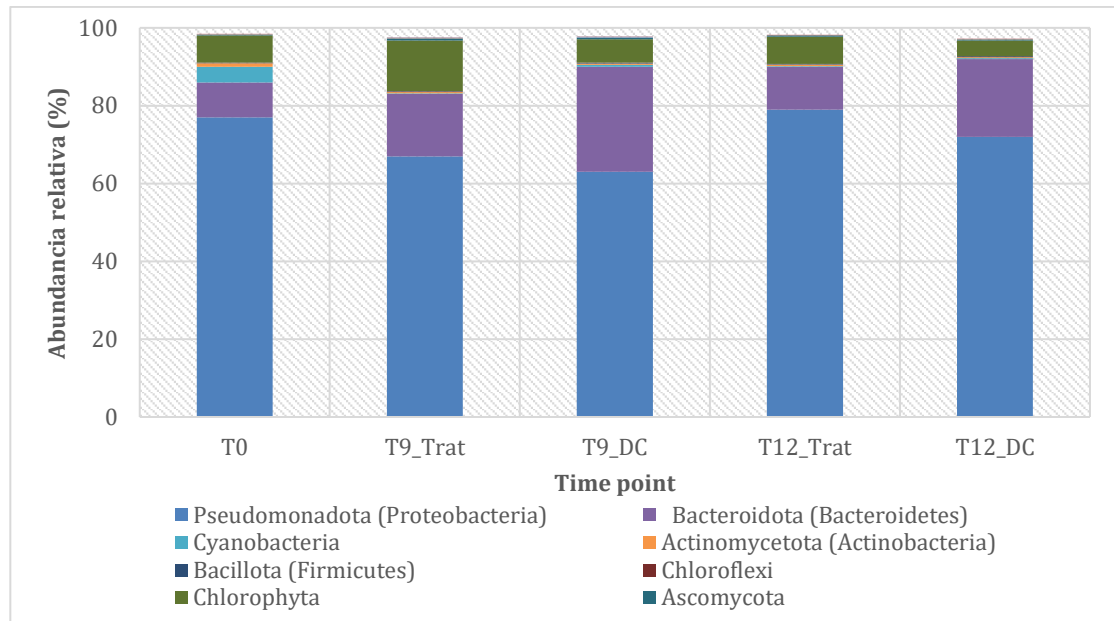


Figura #1. Clasificación taxonómica de los principales filos presentes en el consorcio alga bacteria de la Zona Andina en los distintos *time points*. T0: *time point* 0; T9_Trat : tratamiento *time point* 9; T9_DC: control oscuro del *time point* 9; T12_Trat : tratamiento *time point* 12; T12_DC: control oscuro del *time point* 12 .

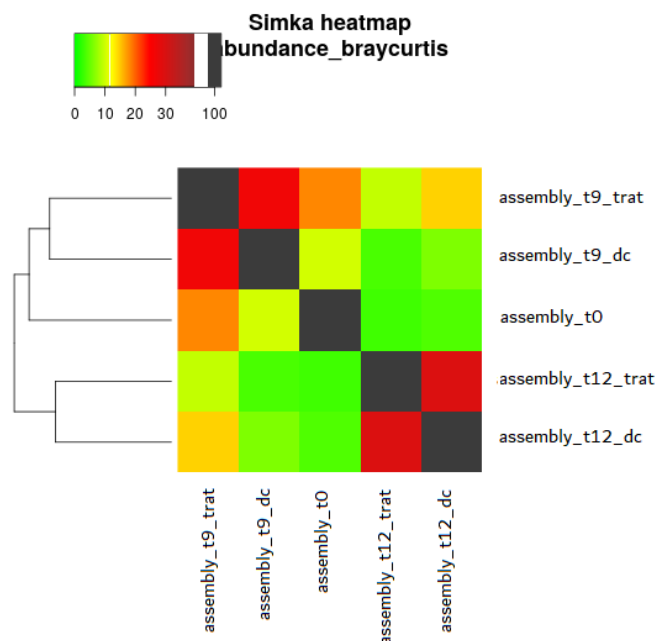


Figura #2. Heatmap de beta diversidad (Bray-Curtis) comparando las diferencias en la composición de las comunidades microbiana entre los diferentes puntos de remoción de

contaminantes. assembly_T0: datos de abundancia en el *time point* 0; assembly_t9_trat : datos de abundancia en el tratamiento del *time point* 9; assembly_t9_dc: datos de abundancia en el control oscuro del *time point* 9; assembly_t12_trat : datos de abundancia en el tratamiento del *time point* 12; assembly_t12_dc: datos de abundancia en el control oscuro del *time point* 12 .

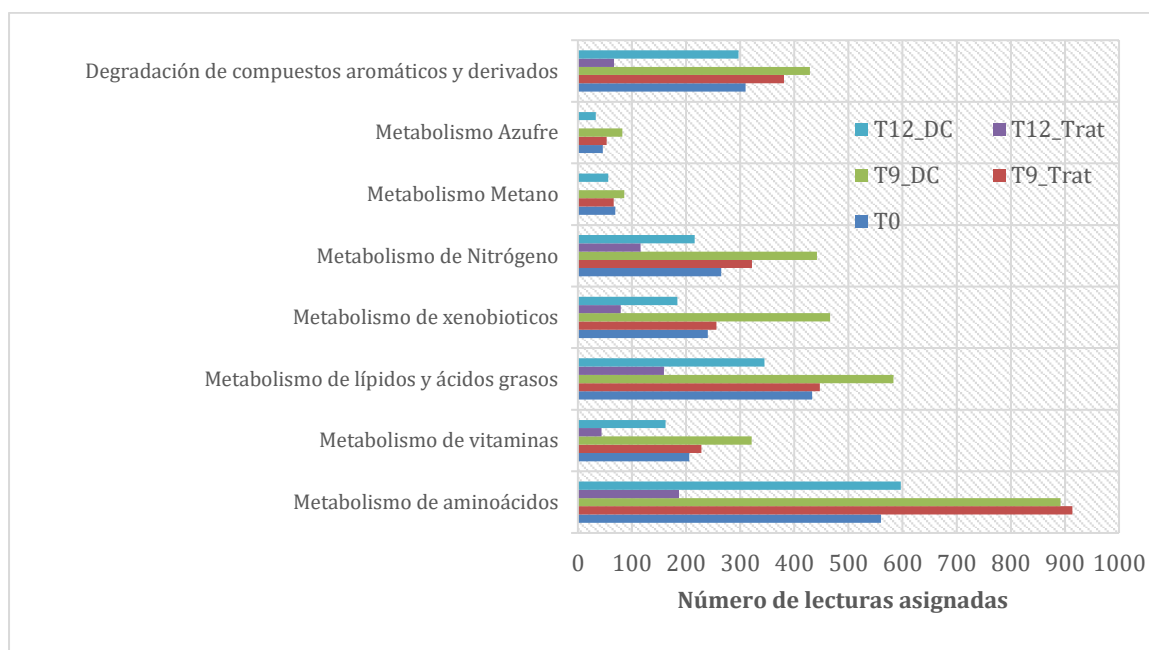


Figura #3. Principales rutas metabólicas compartidas por los consorcios en los distintos *time points* analizados. T0: rutas metabólicas presentes en el *time point* 0; T9_Trat : rutas metabólicas presentes en el tratamiento del *time point* 9; T9_DC: rutas metabólicas presentes en el control oscuro del *time point* 9; T12_Trat : rutas metabólicas presentes en el tratamiento del *time point* 12; T12_DC: rutas metabólicas presentes en el control oscuro del *time point* 12 .

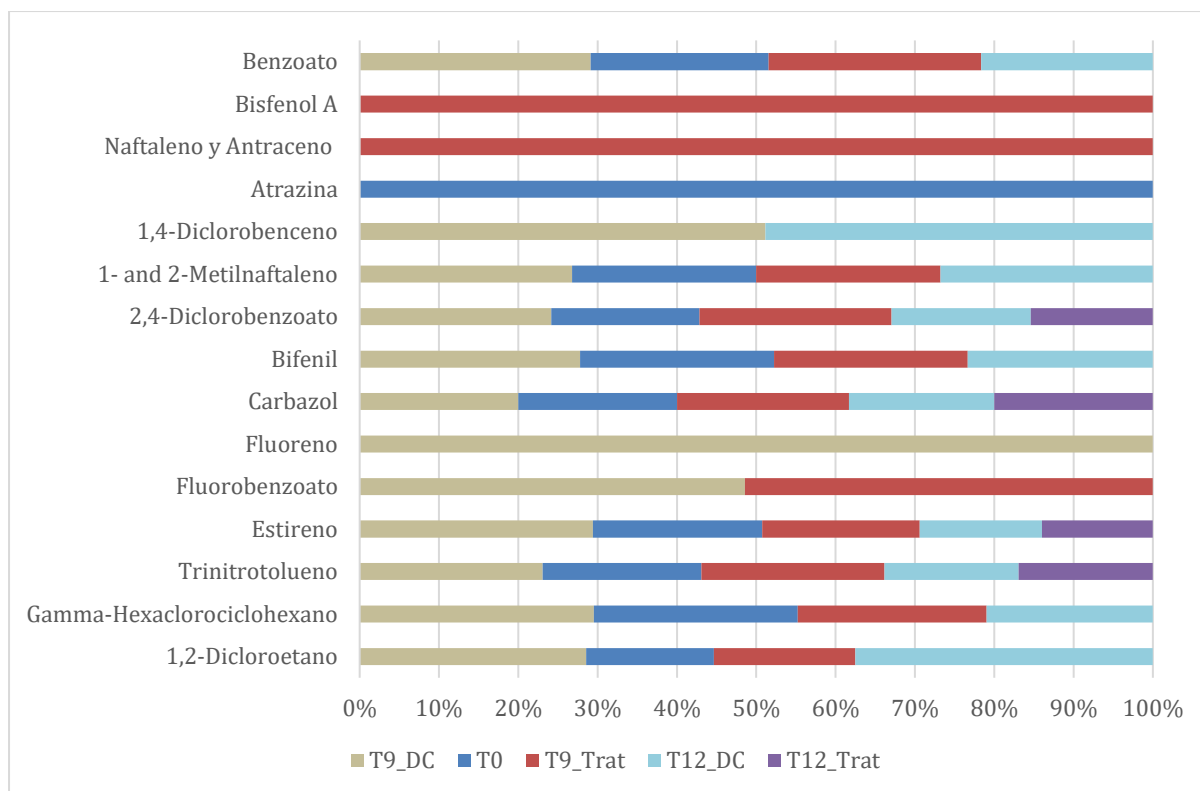


Figura #4. Principales rutas metabólicas involucradas en procesos de degradación de contaminantes presentes en el consorcio analizado en los diferentes *time points*. T0: rutas de degradación de contaminantes presentes en el time point 0; T9_Trat : rutas de degradación de contaminantes presentes en el tratamiento del time point 9; T9_DC: rutas de degradación de contaminantes presentes en el control oscuro del time point 9; T12_Trat : rutas de degradación de contaminantes presentes en el tratamiento del time point 12; T12_DC: rutas de degradación de contaminantes presentes en el control oscuro del time point 12 .

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araric, S., Manna, S., Petrovski, S., Witshire, J., Mann, G., & Franks, A. (2015). Innovative biological approaches for monitoring and improving water quality. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1-8.
- Atashgahi, S., Aydin, R., ..., & Dimitrov, M. (2015). Impact of a wastewater treatment plant on microbial community composition and function in a hyporheic zone of a eutrophic river. *Scientific Reports*, *5*, 172.
- Ayre, J., Mickan, B., Jenkins, S., & Moheimani, N. (2021). Batch cultivation of microalgae in anaerobic digestate exhibits functional changes in bacterial communities impacting nitrogen removal and wastewater treatment. *Algal Research*, *57*.
- Beckman Coulter. (2021). AMPure XP for PCR Purification. California , Estados Unidos.
- Benoit, G., Peterlongo, P., Mariadassou, M., Drezen, E., Schbath, S., Lavenier, D., & Lemaitre, C. (2016). Multiple Comparative Metagenomics using Multiset k-mer Counting. *arXiv*. Retrieved from <https://arxiv.org/abs/1604.02412v3>
- Brooks, J., Edwards, D., Harwich, M., Rivera, M., Fettweis, J., & ... Buck, G. (2015). The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiology*, *15*(1), 1-14.
- Cabrera, H., Garcés, M., & Paredes, P. (2010). *Proyecto de Desarrollo de Capacidades para el Uso Seguro de Aguas Servidas en Agricultura: Producción de Aguas Servidas, Tratamiento y Uso en el Ecuador*. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Quito.
- Coelho, L., Rezende, H., Coelho, M., de Sousa, P., ..., & Coelho, N. (2015). Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms. *Advances in Biorremediation of Wastewater and Polluted Soil*, 1-22. doi:10.5772/60770

- Congestri, R., Savio, S., Farrotti, S., Amati, A., Krasojevic, K., Perini, N., & Migliore, L. (2020). Developing a microbial consortium for removing nutrients. *Water Science & Technology*, *6*(82), 1142-1154. doi:<https://doi.org/10.2166/wst.2020.325>
- Coughlan, L., Cotter, P., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology*, *6*. doi:[10.3389/fmicb.2015.00672](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00672)
- de Celis, M., Belda, I., Ortiz-Álvarez, R., Arregi, L., Marquina, D., ..., & Santos, A. (2020). Tuning up microbiome analysis to monitor WWTPs' biological reactors functioning. *Scientific Reports*, *10*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61092-1>
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D., & Cruts, M. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, *34*(15), 2666-2669. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>
- Deng, J., Zhang, B., Xie, J., Wu, H., Li, Z., Qiu, G., ... Zhu, S. (2020). Diversity and functional prediction of microbial communities involved in the first aerobic bioreactor of coking wastewater treatment system. *PLOS ONE*, *15*(12).
- Elul, M., Rubin-Blum, M., Ronen, Z., Bar-Or, I., Eckert, W., & Sivan, O. (2020). Metagenomic insights into the metabolism of microbial communities that mediate iron and methane cycling in Lake Kinneret iron-rich methanic sediments. *Biogeosciences*, 1-24. doi:<https://doi.org/10.5194/bg-2020-329>
- Eze, M., Hose, G., George, S., & Daniel, R. (2021). Diversity and metagenome analysis of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium from asphalt lakes located in Wietze, Germany. *AMB Express*, *11*(89).
- Gaikwad, G., Wate, S., Ramteke, D., & Kunal, R. (2015). Development of microbial consortia for the effective treatment of complex wastewater. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, *5*(4).

- García, J. (2018, enero). Propuesta Metodológica de Indicadores de Evaluación de Sustentabilidad de Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas Orientadas al Sector Rural. Quito, Pichincha, Ecuador. Retrieved from <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/19075/1/CD-8476.pdf>
- Garner, E., Davis, B., Milligan, E., Blair, M., Keenum, I., Maile-Moskowitz, A., . . . Pruden, A. (2021). Next generation sequencing approaches to evaluate water and wastewater quality. *Water Research, 194*, 116907.
- Guanokuiza, L., & Antúnez, A. (2019). La contaminación ambiental en los acuíferos de Ecuador. Necesidad de su reversión desde las políticas públicas con enfoque bioético. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático, 5(9)*.
- INEC. (2016). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. Retrieved from https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Municipios_2015/Documento_Tecnico-Gestion_de_Agua_y_Alcantarillado_2015.pdf
- Kolmogorov, M., Bickhart, D., Behsaz, B., Gurevich, A., Rayko, M., Bong, S., . . . Pevzner, P. (2020). metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. *Nature Methods*. doi:doi:s41592-020-00971-x
- Kuai, L., Nair, A., & Polz, M. (2010). Rapid and Simple Method for the Most-Probable-Number Estimation of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 67(7)*, 3168-3173.
- Kumar, A., Bhardwaj, R., Kumar, V., & Sharma, A. (2019). New indices regarding the dominance and diversity of communities, derived from sample variance and standard deviation. *Heliyon*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02606>
- Li, Q., Yu, S., Li, L., Liu, G., Gu, Z., Liu, M., & Ren, L. (2017). Microbial Communities Shaped by Treatment Processes in a Drinking Water Treatment Plant and Their

- Contribution and Threat to Drinking Water Safety. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02465
- Li, X., Wu, S., Dong, Y., Fan, H., Bai, Z., & Zhuang, X. (2021). Engineering Microbial Consortia towards Bioremediation. *Water*, 13, 2928.
- Lu, H., Wagner, H., & Chen, X. (2007). A contribution diversity approach to evaluate species diversity. *Basic and Applied Ecology*, 8, 1-12.
- Mattson, L., Soreson, E., Capo, E., Farnelid, H., Hirwa, M., Olofsson, M., . . . Legrand, C. (2021). Functional Diversity Facilitates Stability Under Environmental Changes in an Outdoor Microalgal Cultivation System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.651895>
- Menzel, P., Lee, K., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7(11257). doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Microsoft Corporation. (2018). *Microsoft Excel*. Retrieved from <https://office.microsoft.com/excel>
- Ministerio del Ambiente. (2017). *Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. Retrieved 10 30, 2021, from <https://www.ambiente.gob.ec/las-descargas-de-aguas-residuales-son-controladas-por-el-ministerio-del-ambiente/>
- Morris, K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T., . . . Prati, D. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18). doi:10.1002/ece3.1155
- NCBI. (2021). NCBI Taxonomy to include phylum rank in taxonomic names. *NCBI Insights*. NCBI Taxonomy.

- Niestepski, S., Monika, H., Stawomir, C., Korzeniewska, E., & Osińska, A. (2020). Environmental fate of Bacteroidetes, with particular emphasis on *Bacteroides fragilis* group bacteria and their specific antibiotic resistance genes, in activated sludge wastewater treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*, 394.
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Muhldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H., & Greenwood, A. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*, 9.
- Ojha, N., Karn, R., Abbas, S., & Bhugra, S. (2021). Bioremediation of Industrial Wastewater: A Review. *Earth and Environmental Science*(796), 1-31.
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., . . . Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-7. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- ONT. (2019). Guppy Basecalling Software. Retrieved from <https://nanoporetech.com/>
- ONT. (2019). Native barcoding genomic DNA (with EXP-NBD104, EXP-NBD114, and SQK-LSK109). Oxford, Reino Unido. Retrieved from https://community.nanoporetech.com/protocols/native-barcoding-genomic-dna/checklist_example.pdf
- ONT. (2021). Retrieved 09 25, 2021, from Oxford Nanopore Technologies: <https://nanoporetech.com/products/minion>
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., & Puente, M. (2011). ORGANIC CARBON SUPPLEMENTATION OF STERILIZED MUNICIPAL WASTEWATER IS ESSENTIAL FOR HETEROTROPHIC GROWTH AND REMOVING AMMONIUM BY THE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*(1). *J Phycol*, 47(1), 1529.

- Qi, F., Jia, Y., Mu, R., Ma, G., Qingyang, G., & Qingya, M. (2021). Convergent community structure of algal-bacterial consortia and its effects on advanced wastewater treatment and biomass production. *PubMed*, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-00517-x
- QIAGEN. (2017). *DNeasy® PowerSoil® Kit Handbook*. Retrieved Junio 20, 2021, from <https://www.qiagen.com/nl/resources/resourcedetail?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.R-project.org/>.
- Sanchez, O. (2015). Bacterial Communities in Different Sections of a Municipal Wastewater Treatment Plant Revealed by 16S rDNA 454 Pyrosequencing. In *Bioremediation of Wastewater: Factors and Treatment* (1st ed., pp. 1-22). New York: Apple Academic Press.
- Sathyanarayanan, A., Manda, S., Poojary, M., & Nagaraj, S. (2018). Exome Sequencing Data Analysis. *Reference Module in Life Sciences*, 1-12.
- Saxena, G., & Bharagava, R. (2016). Ram Chandra: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 979-980. doi:10.1007/s10098-015-1084-9
- Sevim, V., Lee, J., Egan, R., Clum, A., Hundley, H., Lee, J., & Woyke, T. (2019). Shotgun metagenome data of a defined mock community using Oxford Nanopore, PacBio and Illumina technologies. *Scientific Data*, 6(1).
- Shah, A., & Shah, M. (2020). Characterisation and bioremediation of wastewater: A review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical wastewater. *Groundwater for Sustainable Development*, 11, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gsd.2020.100383>

- Shahraki, A., Chaganti, S., & Heath, D. (2021). Spatio-temporal dynamics of bacterial communities in the shoreline of Laurentian great Lake Erie and Lake St. Clair's large freshwater ecosystems. *BMC Microbiology*, 21. doi:<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02306-y>
- Sharma, I. (2020). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. In I. Sharma, *Trace Metals in the Environment - New Approaches and Recent Advances*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.90453
- Shetty, P., Boboescu, I., Pap, B., Wirth, R., Kovacs, K., Biró, T., & Maroti, G. (2019). Exploitation of Algal-Bacterial Consortia in Combined Biohydrogen Generation and Wastewater Treatment. *Frontiers in Energy Research*, 7. doi:10.3389/fenrg.2019.00052
- Sidhu, C., Vikram, S., & Pinnaka, A. (2017). Unraveling the Microbial Interactions and Metabolic Potentials in Pre- and Post-treated Sludge from a Wastewater Treatment Plant Using Metagenomic Studies. *Frontiers in Microbiology*(8), 82-92. doi:10.3389/fmicb.2017.01382
- Tamames, J., & Puente-Sánchez, F. (2019). SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Qubit™ 4 Fluorometer*. Retrieved from ThermoFisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits*. Retrieved from Fisher Scientific: <https://www.fishersci.es/shop/products/qubit-dsdna-hs-br-assay-kits/10616763>
- Wagner, D., Grunwald, G., Zerbe, G., Mikulich, S., Robertson, C., Zemanick, E., & Harris, J. (2018). On the Use of Diversity Measures in Longitudinal Sequencing Studies of

- Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 9.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01037>
- Wick, R., Judd, L., Gorrie, C., & Holt, K. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics*, 3(10).
doi:10.1099/mgen.0.000132
- Willis, A. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., . . . Zhou, J. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology*, 4(7), 1183-1195.
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., . . . Brown, M. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology*, 4, 1183-1195.
- Yasir, M. (2021). Analysis of Microbial Communities and Pathogen Detection in. *Diversity*, 13(6).
- Ye, L., & Zhang, T. (2013). Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2681-2690. doi:10.1007/s00253-012-4082-4
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., & ... Tay, J. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118.
- Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S., & Alvarez, L. (2015). High-Throughput Metagenomic Technologies for Complex Microbial Community Analysis: Open and Closed Formats. *mBio*, 6(1), e02288-14.