



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE UN BIORREACTOR HÍBRIDO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL PORCÍCOLA.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

MARÍA ELENA OCHOA HERNÁNDEZ

Hermosillo, Sonora, México

8 de julio del 2022

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 08 de Septiembre del 2022.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Evaluación de la Comunidad Microbiana de un Biorreactor Híbrido para el Tratamiento de Agua Residual Porcícola**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestro en Biociencias**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE

María Elena Ochoa Hernández



Nombre y Firma del Autor



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Hermosillo, Sonora, México

Septiembre, 2022.

EVALUACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE UN BIORREACTOR HÍBRIDO
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL PORCÍCOLA.

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS MOLECULARES

presenta:

MARÍA ELENA OCHOA HERNÁNDEZ

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Evaluación de la Comunidad Microbiana de un Biorreactor Híbrido para el Tratamiento de Agua Residual Porcícola presentada por María Elena Ochoa Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con Especialidad Molecular.



Dra. Kadiya Del Carmen Calderón Alvarado
Director y Presidente



Dra. Denisse Serrano Palacios
Co-Director

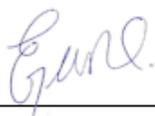


Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Sinodal interno y Secretario

RODELAS
GONZALEZ
MARIA BELEN -
24226613T

Firmado digitalmente
por RODELAS
GONZALEZ MARIA
BELEN - 24226613T
Fecha: 2022.06.22
23:11:29 +02'00'

Dra. María Belén Rodelas González
Sinodal externo



Dra. Estefanía Garibay Valdez
Sinodal externo

DEDICATORIA

A mi Señor y Salvador Jesucristo, sin quién nada tendría sentido. Por qué todo es por Él y para él. Por permitirme conocer más de su creación, y por tanto más de Él.

¡Oh, Señor Jehová! he aquí que tú hiciste el cielo y la tierra con tu gran poder, y con tu brazo extendido, ni hay nada que sea difícil para ti. (Jeremías 32:8, RVR 1960). Levanten en alto sus ojos y miren quién ha creado estas cosas. Él saca y cuenta al ejército de ellas; a todas llama por su nombre. Por la grandeza de su vigor y el poder de su fuerza, ninguna faltará (Isaías 40:26, RVA-2015).

A mi amado esposo, Armando Verdugo. A mi familia (Gonzalo H.L, Gonzalo H.D, Belén, Rogelio, Ana Paula, Luisa, Fernando) y principalmente, a mis amados padres Gustavo y Verónica.

A la segunda familia que tengo en la iglesia, por sus muchas oraciones. A Claudia y Mario Ceja. A mi querida amiga Kathya Díaz, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad de Sonora**, al **Instituto Tecnológico de Sonora** (ITSON) y al por el apoyo brindado para poder crecer como profesionista y permitirme formar parte de este proyecto de ciencia básica CB-2017-2018 (A1-S-43472) dentro del programada de Posgrado en Biociencias (clave USO 313006887). Gracias al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría (1076858).

Agradezco a todo el comité de tesis que estuvo corrigiéndome, guiándome y alentándome durante cuatro semestres. A la **Dra. Kadiya Calderón**, por creer en mí desde el principio; por la paciencia, la confianza, la motivación y por compartirme sus conocimientos, ha sido un placer trabajar con usted. A la **Dra. Denisse Serrano Palacios** del ITSON, por las muchas horas de trabajo dedicadas, su grande paciencia y su gran esfuerzo en este proyecto. Gracias a la **Dra. Belén Rodelas González** de la Universidad de Granada, quien a pesar de la distancia siempre se mantuvo cerca, apoyándome y compartiendo su conocimiento con gran disposición. Al **Dr. Luis Martínez Córdova** y a la **Dra. Estefanía Garibay**, por sus valiosas aportaciones y asesoría brindada durante este proyecto.

Agradezco también al **Dr. Ulises Durán** de la Universidad Autónoma Metropolitana y a la **Dra. Rocío Alcántar** de la Universidad Autónoma de México (UNAM), quienes formaron parte de este proyecto. Gracias a la **Dra. Andrea Reynoso** por su contribución al desarrollo de este trabajo.

Gracias a la **M.C. Dolores Vásquez Del Castillo**, por ayudarme con tan buena disposición en todo momento, aun cuando no eran horas de trabajo. A la **Dra. Violeta Larios**, por transmitirme su conocimiento y gusto por la bioinformática.

RESUMEN

Debido a las elevadas concentraciones de contaminantes que posee el agua residual porcícola, ésta debe ser tratada previo a su disposición. Un solo tratamiento biológico convencional suele ser insuficiente para remover los contaminantes del agua, por tanto, la combinación de tecnología aerobia y anaerobia en un solo sistema híbrido puede hacer posible obtener agua tratada de mejor calidad. Como el desempeño y el éxito del sistema híbrido dependen de la comunidad microbiana presente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la comunidad microbiana de un sistema híbrido para el tratamiento de agua residual porcícola. Se extrajeron ADN y ARN de las dos fases del biorreactor híbrido y de un reactor convencional tipo UASB, los cuales se analizaron por secuenciación tipo Illumina. El análisis bioinformático se realizó mediante DADA2 en RStudio. Se obtuvieron las abundancias relativas de las especies principales, se evaluaron alfa y beta diversidad, y se evaluó la influencia de los parámetros fisicoquímicos en las comunidades microbianas. Las especies principales encontradas en todas las muestras corresponden a los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes*, así como a *Methanosaeta*, el único género de arqueas encontrado. La comunidad aerobia resultó menos diversa entre las muestras evaluadas. Se encontraron especies nitrificantes en el biorreactor híbrido. El análisis de beta diversidad reveló que las comunidades microbianas evaluadas son estadísticamente diferentes entre sí. Se encontraron diferencias entre la comunidad total y la comunidad metabólicamente activa. Respecto al perfil funcional, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de las reacciones principales. No se encontró influencia significativa de los parámetros fisicoquímicos evaluados sobre la diversidad de las comunidades microbianas, indicando que el efecto del inóculo y el sistema en el que se desarrollan influencia cada comunidad. Las diferencias entre la microbiota total y la metabólicamente activa, resaltan la importancia de estudiar ambas para comprender los cambios en las dinámicas de las comunidades microbianas.

ABSTRACT

Due to the high concentrations of pollutants that swine wastewater has, it must be treated before its disposal. One single conventional biological treatment is usually insufficient to remove pollutants from water, therefore, the combination of aerobic and anaerobic technologies in one hybrid system can make the obtention of high-quality treated water possible. Because the performance and success of the hybrid system depend on the microbial community present in the bioreactor, the aimed to evaluate the microbial community of a hybrid bioreactor for swine wastewater treatment. DNA and RNA were extracted from the two phases of the hybrid bioreactor, and from a conventional UASB reactor, which were analyzed by Illumina sequencing. Bioinformatic analysis was carried out in DADA2 in RStudio. The relative abundance of the main species was obtained, alpha and beta diversity were evaluated, and the influence of the physic-chemical parameters over the microbial communities was also evaluated. The results show that a considerable specie number belongs to phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes*, as well as *Methanosaeta*, which was the only archaeal genus found. The aerobic community was found the less diverse within the samples evaluated. Nitrifying species were found in the hybrid bioreactor. Beta diversity analysis revealed that the evaluated microbial communities are statistically different from each other. Differences were found between the composition of the total and the metabolically active microbial communities. Regarding the functional profile, significant differences were found in the abundance of main reactions. No significant influence of the physic-chemical parameters evaluated was found, indicating that the effect of the inoculum and the system where they developed influenced each community. Differences between total and metabolically active microbiota highlight the importance of studying both to comprehend the changes in the dynamics of microbial communities.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1 Contaminación por aguas residuales	3
I.2 Tratamientos biológicos de aguas residuales	4
I.2.1 Degradación de contaminantes por vía anaerobia	5
I.2.1.1 Microorganismos de la digestión anaerobia	6
I.2.2 Degradación de contaminantes por vía aerobia	7
I.2.2.1 Nitrificación y desnitrificación	8
I.2.3 Sistemas biológicos para tratamientos de agua residual	9
I.2.3.1 Sistema aerobio-anaerobio	11
I.3 Efecto de los parámetros operacionales y condiciones ambientales en las comunidades microbianas.	12
I.4 Herramientas metagenómicas para el estudio de comunidades microbianas.	13
II. HIPÓTESIS	16
III. OBJETIVOS	17
III.1 Objetivo general	17
III.2 Objetivos específicos	17
IV. METODOLOGÍA	18
IV.1 Sistema híbrido aerobio-anaerobio	18
IV.2 Muestreo de biomasa	18
IV.3 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc	19
IV.4 Amplificación por PCR, construcción de librerías y secuenciación 16S rRNA	20
IV.5 Análisis bioinformático y estadístico	20

V. RESULTADOS Y DISCUSION	22
V.1 Alfa diversidad	23
V.2 Abundancia relativa	26
V.3 Beta diversidad	30
V.4 Predicción de las funciones metabólicas	32
V.5 Influencia de los parámetros fisicoquímicos sobre las comunidades microbianas	35
VI. CONCLUSIONES	39
VII. LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Reacciones involucradas en la digestión anaerobia	5
2	Nitrificación y desnitrificación.	9
3	Diseño del biorreactor híbrido aerobio-anaerobio	19
4	Curvas de rarefacción producidas del análisis de secuenciación	23
5	Índice de Shannon-Wiener	24
6	Índice Inverso de Simpson	24
7	Abundancia relativa de los géneros más abundantes en las muestras.	27
8	Análisis de componentes principales (PCoA) utilizando una matriz de distancias calculada con el índice de Bray-Curtis.	30
9	Predicción de las funciones microbianas	34
10a y b	Análisis de escalamiento multidimensional. Influencia de los parámetros físicoquímicos sobre las comunidades microbianas	36
11	Influencia de los géneros principales en las comunidades microbianas evaluadas.	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Límites permisibles de contaminantes en aguas residuales según su lugar de descarga	3
2	Enzimas y productos del proceso de hidrólisis.	6
3	Tratamientos biológicos	10
4	Características de los tratamientos aerobios y anaerobios	11
5	Efecto de los parámetros operacionales sobre los tratamientos biológicos	13
6	Número de secuencias 16S ARNr obtenidas por NGS	22
7	Principales reacciones microbianas	33

INTRODUCCIÓN

La industria porcícola en México se encuentra en crecimiento, buscando incrementar el comercio nacional e internacional (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021). En el 2021, se estimó que la producción de carne de cerdo fue de aproximadamente 1,686,802 toneladas en el año, superando la producción del año 2020 (SIAP, 2021). Sin embargo, la porcicultura tiene un importante impacto ambiental, especialmente a través de la generación de residuos (Rosa *et al.*, 2017).

El agua residual porcícola, es conocida por su alto contenido de materia orgánica y nutrientes, convirtiéndose en una fuente de contaminación significativa, especialmente para los cuerpos de agua donde es vertida (Cervantes *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2018). El 38% de las granjas porcícolas en México vierten sus aguas residuales en suelos y cuerpos de agua, sin ningún tratamiento previo; además, se estima que solo una pequeña proporción de las granjas porcícolas cumple con las regulaciones establecidas por las normas oficiales mexicanas para la disposición de agua (González-Tineo *et al.*, 2020).

Los tratamientos biológicos son una alternativa sustentable y costo-efectiva para el manejo de las aguas residuales, involucrando el uso de microorganismos que llevan a cabo los procesos de biodegradación de contaminantes (Ali *et al.*, 2019; Arnáiz *et al.*, 2000). Los tratamientos biológicos pueden ser anaerobios o aerobios, aunque los tratamientos anaerobios suelen ser más apropiados para las aguas con mayor carga orgánica, ya que tienen la ventaja de producir biogás y bajos requerimientos energéticos (Calderón *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2021).

No obstante, un solo tratamiento biológico no puede eliminar los contaminantes por completo, por tanto, un sistema híbrido que combine dos o más tecnologías puede ofrecer una mayor eficiencia de remoción y agua tratada de buena calidad (Gadipelly *et al.*, 2014; González-Tineo *et al.*, 2020).

Por otro lado, también es importante considerar que los microorganismos que llevan a cabo la biodegradación de materia orgánica pueden verse afectados con la presencia de contaminantes y por los parámetros operacionales del reactor como temperatura pH, tiempo de

retención hidráulica, carga orgánica, granulación y mezclado (Alexandrino *et al.*, 2017; Daud *et al.*, 2017; Sanz & Köchling, 2019). Consecuentemente, es necesario caracterizar las comunidades microbianas de los sistemas biológicos para tratamiento de aguas residuales, evaluando cómo las comunidades se alteran ante el sustrato, presencia de contaminantes y las condiciones operacionales (Parades-Aguilar *et al.*, 2021).

La secuenciación masiva de nueva generación (NGS), por sus siglas en inglés, permite caracterizar la microbiota de una muestra, utilizando como blanco el gen 16S rRNA, permitiendo determinar la estructura y composición de la comunidad microbiana; sin embargo, al trabajar solamente con ADN no se puede inferir que miembros de la comunidad microbiana están activos y participando en el proceso de biodegradación (Maurice *et al.*, 2013; Sanz and Köchling, 2013; Parades-Aguilar *et al.*, 2021).

Por ello, secuenciar también el ARN permite hacer un análisis funcional de las comunidades microbianas, proveyendo un mejor conocimiento de la influencia de los parámetros operacionales de las comunidades y permitiendo estudiar las respuestas microbianas a los cambios ambientales (DeVrieze *et al.*, 2016; Bang-Andreasean *et al.*, 2020); Yan *et al.*, 2017). Así pues, la secuenciación de ARN permite ligar la identidad bacteriana con la actividad microbiana (Maurice *et al.*, 2013). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios de una comunidad microbiana de un biorreactor híbrido y de un reactor UASB para tratamiento de agua residuales porcícola vs la comunidad metabólicamente activa. También se analizó el perfil funcional microbiano y se realizaron análisis multivariados para correlacionar los parámetros operacionales y los datos biológicos de ambos reactores.

I. ANTECEDENTES

I.1 Contaminación por aguas residuales

La materia orgánica y los nutrientes como nitrógeno y fósforo son los principales contaminantes de las aguas residuales (Akpor *et al.*, 2014). Específicamente, las aguas residuales porcícolas se caracterizan por tener elevadas concentraciones de estos contaminantes (Cervantes *et al.*, 2007). Según lo reportado por Coma *et al.* (2004), el agua residual porcícola contiene aproximadamente 7,600 mg/L de nitrógeno total, 6,500 mg/L de fosfatos y 47,00 mg/L de Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Estas concentraciones superan el límite permisible de contaminantes establecido por las normas oficiales mexicanas para las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (NOM-001-Sermanat-2021. En la Tabla 1 se muestra la información correspondiente sobre los límites permisivos de contaminantes en aguas residuales que serán vertidas en suelos y cuerpos de agua.

Tabla 1. Límites permisibles de contaminantes en aguas residuales según su lugar de descarga. Adaptada de NOM-001-SEMARNAT-1996.

Parámetros (mg/L)	Ríos	Embalses	Aguas costeras	Suelos	
	Protección de vida acuática	Uso público	Explotación pesquera	Estuarios	Humedal natural
Grasas y aceites	15	15	15	15	15
SST	40	40	150	75	75
Sólidos sedimentables	1	1	1	1	1
DBO ₅	30	30	150	75	75
Fósforo total	15	15	NA	15	NA
Nitrógeno total	5	5	NA	5	NA

Las concentraciones se encuentran en mg/L. NA: no aplicable.

El exceso de nutrientes causa severos problemas de contaminación acuática; las concentraciones elevadas de nitrógeno y fósforo favorecen la eutrofización, además de influir sobre las comunidades acuáticas y causar problemas en la estabilidad de los ecosistemas acuáticos (Cárdenas y Sánchez, 2013). Una vez introducida la materia orgánica en cuerpos de agua, las bacterias presentes en el medio se encargarán de estabilizarla, sin embargo, esto implicará un alto consumo del oxígeno presente en el medio, provocando una disminución importante de oxígeno disuelto (OD) disponible (Von Sperling, 2007).

Es por ello que, la concentración de OD es un parámetro muy importante para la determinación de la calidad del agua (Gholizadeh *et al.*, 2016). Comúnmente, los análisis de calidad de agua implican la determinación de dos parámetros: la DQO y la demanda biológica de oxígeno (DBO) (López-Vázquez *et al.*, 2017). La DBO es la cantidad de oxígeno requerido por las bacterias aerobias para estabilizar la materia orgánica; mientras que la DQO es la cantidad de oxígeno requerido para degradar la materia orgánica e inorgánica a través de la oxidación química, y este suele ser el parámetro más importante para conocer la medida de contaminación en aguas residuales (López-Vázquez *et al.*, 2017; Gholizadeh *et al.*, 2016; Roldán y Ramírez, 2008). El rango de valores de DQO suele ser de 20 mg/L en aguas poco contaminadas, mientras que las aguas más contaminadas varían desde 100 mg/L hasta 60,000 mg/L de DQO (Jain, Singh, 2003).

I.2 Tratamientos biológicos de aguas residuales

Debido al impacto ambiental de las aguas residuales, es indispensable que estas sean tratadas previo a su disposición. Los tratamientos biológicos son útiles para el tratamiento de la mayoría de las aguas residuales, suelen tener menores costos que otros tipos de tratamientos y no causan contaminación secundaria (Chan *et al.*, 2009). El objetivo de los tratamientos biológicos es la degradación de los contaminantes presentes en las aguas residuales por medio de la acción de los microorganismos, los cuales, utilizan los contaminantes como nutrientes para poder desarrollarse (Jung & Pauly, 2011). Los tratamientos biológicos pueden ser aerobios (en presencia de oxígeno libre o disuelto), donde los microorganismos degradan los contaminantes

a biomasa y CO₂, o anaerobios (ausencia de oxígeno), donde los contaminantes son degradados a CH₄, CO₂ y H₂O (Chan *et al.*, 2009).

I.2.1 Degradación de contaminantes por vía anaerobia

El proceso anaerobio de degradación de contaminantes es un proceso de fermentación llevada a cabo en ausencia de oxígeno, donde se obtiene una mezcla de gases como producto (conocida como biogás) y una suspensión acuosa (lodo anaerobio) que contiene los microorganismos responsables de la degradación (Loreno y Obaya, 2005).

Este proceso consta de cuatro etapas, las cuáles se explican más detalladamente en la Figura 1. El proceso comienza con la hidrólisis, en la cual, los microorganismos utilizan como sustrato a las moléculas orgánicas más grandes y mediante enzimas, las degradan a moléculas de menor tamaño, convirtiendo los polímeros en monómeros (Lorenzo y Obaya, 2005; Parra, 2015). Las bacterias hidrolíticas encontradas en procesos anaerobios suelen pertenecer a los filos Firmicutes y Bacteroidetes (Amin *et al.*, 2021).

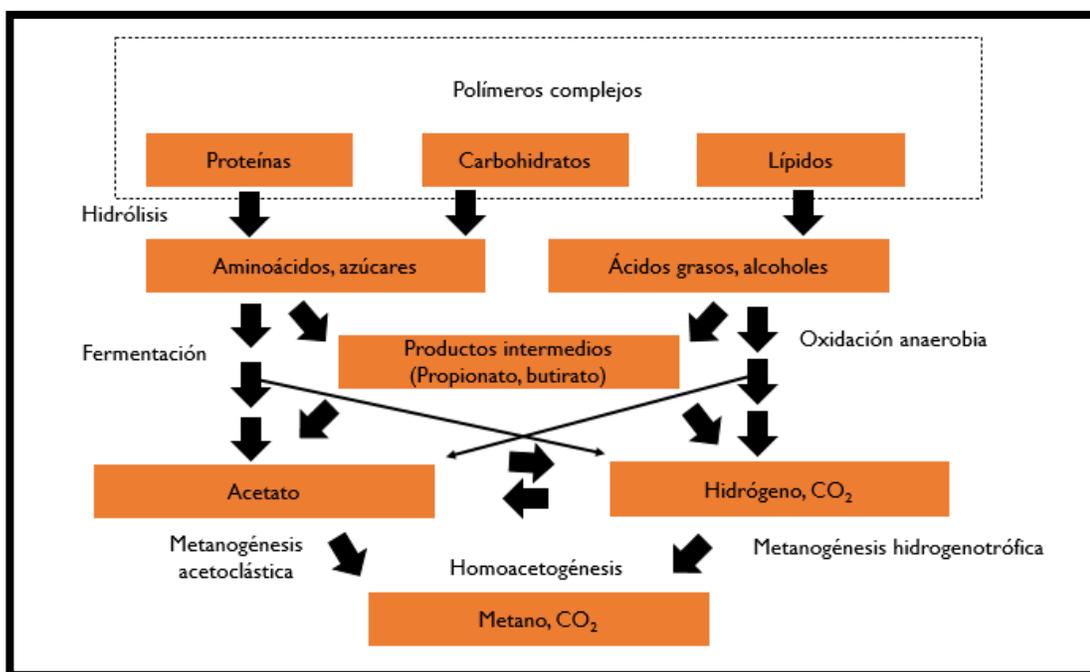


Figura 1. Reacciones involucradas en la digestión anaerobia. Modificado de López-Vázquez *et al.* (2017).

La Tabla 2 muestra las principales enzimas que intervienen en el proceso de hidrólisis y los productos que se obtienen.

Tabla 2. Enzimas y productos del proceso de hidrólisis. Adaptada de Adekunele *et al.* (2015).

Sustrato	Enzima	Producto
Proteínas	Proteinasa	Aminoácidos
Celulosa	Celulasa	Celobiosa y glucosa
Hemicelulosa	Hemicelulasa	Glucosa, xilosa, manosa y arabinosa
Almidón	Amilasa	Glucosa
Lípidos	Lipasa	Ácidos grasos y glicerol
Pectina	Pectinasa	Ácido poligalacturónico

Posteriormente, comienza la acidogénesis y durante esta, los aminoácidos y los azúcares son degradados a través de reacciones fermentativas a ácido butírico, propiónico, acético e hidrógeno, los cuales son precursores de la metanogénesis (Grady *et al.*, 2011). Las bacterias acidogénicas se encuentran en mayor proporción que las arqueas metanógenas y son más resistentes a las fluctuaciones en los parámetros operacionales (como temperatura y pH) (Amin *et al.*, 2021).

Seguido de la acidogénesis, las bacterias acetogénicas utilizan ácidos grasos como el ácido butírico para producir precursores de la metanogénesis: H₂ y ácido acético (Hassan *et al.*, 2022). El proceso de digestión anaerobia finaliza con la metanogénesis, mediante la cual las arqueas metanógenas utilizan los productos de la acidogénesis para producir metano (Grady *et al.*, 2011). Las arqueas metanógenas se dividen en dos grandes grupos: acetoclásticas o hidrogenófilas, según la ruta utilizada para la producción de metano (Arnaíz *et al.*, 2000).

I.2.1.1 Microorganismos de la digestión anaerobia

Los diferentes tipos de microorganismos implicados en este proceso de degradación (bacterias hidrolíticas, bacterias acetogénicas y acidogénicas, y arqueas metanógenas) interactúan de manera sintrófica para llevar a cabo la digestión anaerobia (Enitan *et al.*, 2017). Los diferentes

microorganismos que participan en la digestión anaerobia han sido ampliamente estudiados, los cuales se mencionan a continuación:

Las bacterias hidrolíticas, las cuales son las encargadas de comenzar con el proceso de digestión anaerobia, suelen pertenecer a los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (Menzel *et al.*, 2020). A nivel de género, destacan *Propionobacterium*, *Clostridium*, *Micrococcus* y *Bacteroides* (Corrales *et al.*, 2015). En general, las bacterias hidrolíticas son menos sensibles a los cambios ambientales como el pH y la temperatura, siendo más resistentes que las arqueas metanógenas (Venkiteshwaran *et al.*, 2015).

Como participantes de la acidogénesis, se han encontrado diversas especies como *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Peptococcus* y *Corynebacterium* (Nguyen *et al.*, 2018). En el caso de las bacterias involucradas en la etapa de acetogénesis resaltan *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*, las cuales producen H_2 y CO_2 a través de la oxidación de ácidos grasos; no obstante, participan también las bacterias homo acetogénicas, las cuales producen acetato solamente como producto de la oxidación de ácidos grasos, y entre las cuales se conocen a los géneros *Clostridium* y *Acetobacterium* (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Por último, se encuentran las arqueas metanógenas. Los metanógenos son microorganismos capaces de producir grandes cantidades de metano y se clasifican en ocho órdenes: Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanopyrales, Methanococcales, Methanocellales, Methanomassiliicoccales, Methanonatronarchaeale, Methanoliparales y Methanosarcinales (Borrel *et al.*, 2019; Enzman *et al.*, 2018; Lino *et al.*, 2013; Sakai *et al.*, 2008; Sorokin *et al.*, 2018).

I.2.2 Degradación de contaminantes por vía aerobia

En el caso de la digestión aerobia, las bacterias utilizan el oxígeno disuelto en el agua para degradar los contaminantes mediante hidrólisis para la obtención de energía a partir de ellos, siendo el resultado final del proceso dióxido de carbono, biomasa y agua (Akpór *et al.*, 2014; Mittal, 2011). La degradación aerobia en tratamientos de agua suele estar atribuida a microorganismos de géneros como *Bacillus*, *Acineobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*,

Aeromonas y *Flavovacterium*, los cuales producen enzimas para reducir polímeros complejos a monómeros simples (Arnáiz *et al.*, 2000). Los procesos de degradación aerobia ocurren en la superficie de los gránulos del lodo, donde también se llevan a cabo los procesos de nitrificación y desnitrificación (Chen *et al.*, 2018).

I.2.2.1 Nitrificación y desnitrificación

Debido a que el agua residual porcícola es una fuente de contaminación con nitrógeno (Kim *et al.*, 2004) es importante tomar en cuenta los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación en el tratamiento de aguas residuales porcícola. En los procesos de nitrificación y desnitrificación, los compuestos nitrogenados tóxicos son convertidos a productos no contaminantes, y son la vía más efectiva para la eliminación de nitrógeno (Cárdenas y Sánchez, 2013).

Durante la nitrificación, las formas reducidas de nitrógeno orgánico e inorgánico son reducidas a amonio por bacterias oxidantes de amonio (AOB) y oxidadas a nitrato por bacterias oxidantes de nitritos (NOB) (Arp, 2009; Kornaros, 2010). La oxidación de amonio también es realizada por algunas arqueas, las cuales son conocidas como oxidantes de amonio (AOA) y pertenecen al filo Crenarchaeota (Andrade-Ochoa *et al.*, 2015).

Los géneros bacterianos mayormente encontrados en sistemas de agua a los que se les atribuye el proceso de nitrificación son *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* y *Nitrotoga* (Nielsen *et al.*, 2009; Spieck *et al.*, 2021). En particular, dentro del género *Nitrospira* se encuentra un microorganismo capaz de realizar la conversión de amoníaco de manera directa en nitrato, proceso conocido como commamox; esta ruta metabólica hace que las bacterias commamox sean distintas de otros nitrificadores, los cuales, además, se ha reportado que suelen dominar sobre otras especies nitrificantes en lodos activados (Mehrani *et al.*, 2021).

La Figura 2 muestra un esquema de ambos procesos de eliminación de nitrógeno. En la primera etapa, los nitratos son reducidos a óxidos de nitrógeno gaseoso (como óxido de nitrógeno, óxido nitroso o nitrógeno libre) y al contrario de la nitrificación, este proceso suele llevarse a cabo por microorganismos anaerobios heterótrofos (Nielsen y Hansen, 2009). En

conjunto, la nitrificación y desnitrificación logran la eliminación de compuestos nitrogenados de las aguas residuales (Nielsen y Hansen, 2009).

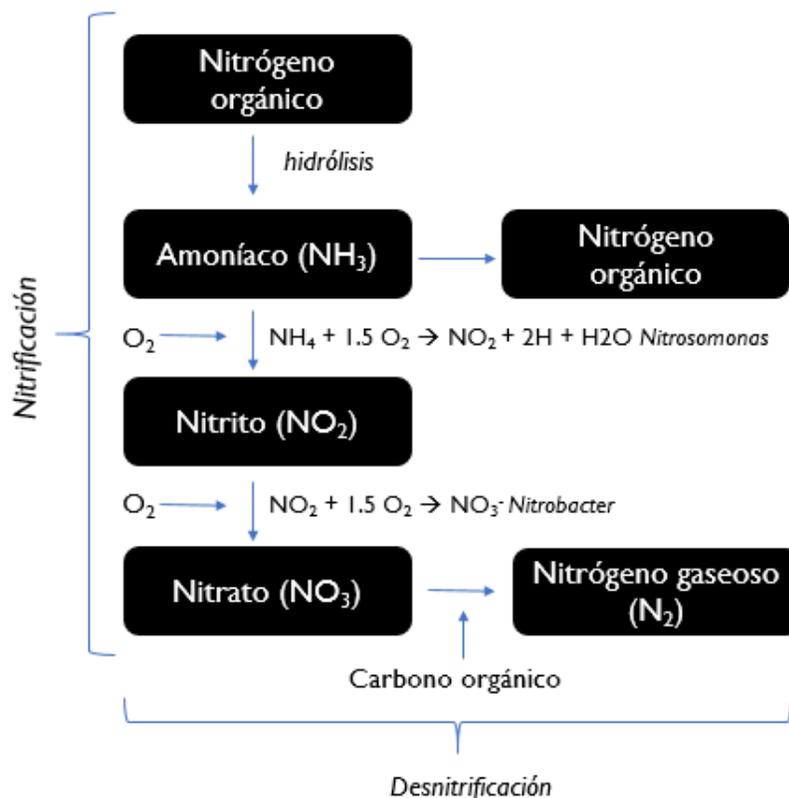


Figura 2. Nitrificación y desnitrificación. Modificado de Cárdenas y Sánchez (2013).

I.2.3 Sistemas biológicos para tratamientos de agua residual

Los tratamientos biológicos son aquellos mediante los cuales la biodegradación de contaminantes ocurre por vía biológica. Existen diversos tratamientos biológicos empleados para el tratamiento de aguas residuales. En la Tabla 3 se presenta una breve descripción de algunos de los tratamientos biológicos más ampliamente utilizados.

Tabla 3. Tratamientos biológicos (von Sperling, 2007; López-Vázquez *et al.*, 2008).

Tratamiento	Tipo	Descripción
Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB)	Anaerobio	El agua residual viaja de forma ascendente. La parte superior del reactor tiene una zona de asentamiento y otra para colectar el biogás. El retorno de los sólidos se da través del reactor por gravedad.
Lodos activados	Aerobio	El sistema se compone de un tanque de aireación y un tanque de sedimentación, con aireación y recirculación de sólidos. Suele tener eficiencias de remoción altas.
Biorreactores de membrana	Aerobio	Combinación de lodos activados con micro o ultrafiltración en un biorreactor de crecimiento suspendido.
Humedales artificiales	Aerobio	Son sistemas compuestos por canales donde crecen plantas acuáticas, implicando métodos físicos, biológicos y químicos para tratamiento de aguas.
Infiltración de aguas residuales	Aerobio	Las aguas residuales son vertidas por debajo de la superficie del suelo. Las cámaras de infiltración son rellenadas con un medio poroso, que funciona como transporte y almacenamiento.
Filtro anaerobio	Anaerobio	La estabilización de la DBO se lleva a cabo por los microorganismos que crecen en el medio de soporte que se encuentre en el reactor. Este sistema requiere un tanque de sedimentación.
Estanque facultativo	Aerobio-anaerobio	El agua residual fluye a través del estanque durante un largo período de tiempo. La DBO soluble es estabilizada por vía aerobia, mientras que la DBO en suspensión es estabilizada por vía anaerobia. Las algas aportan el oxígeno necesario para la biodegradación aerobia.

Los tratamientos biológicos anaerobios y aerobios ofrecen distintas ventajas y desventajas. Entre los principales factores que suelen considerarse se encuentra la eficiencia de remoción, donde los sistemas aerobios suelen alcanzar mayores eficiencias de remoción de materia orgánica en comparación a los sistemas anaerobios; sin embargo, los sistemas aerobios no son adecuados para aguas residuales con concentraciones elevadas de DQO (superiores a

1,000 mg/L), implican un costo mayor debido a la aireación y producen una alta cantidad de lodos (Bernet y Paul, 2006; Sikosana *et al.*, 2019). Además, se estima que los porcentajes de remoción de la mayoría de los sistemas utilizados para el tratamiento de aguas residuales porcícola es muy bajo, con eficiencias no mayores del 60% para los reactores UASB, los estanques facultativos, estanques anaerobios y biodigestores en general (González-Tineo *et al.*, 2020). La Tabla 4 compara las características principales entre ambos tipos de tratamiento.

Tabla 4. Características de los tratamientos aerobios y anaerobios (adaptada de Chen *et al.*, 2009).

Característica	Aerobio	Anaerobio
Calidad del efluente	Excelente	Moderada a baja
Tolerancia carga orgánica	Moderada	Alta
Producción de lodo	Alta	Baja
Requerimiento de nutrientes	Alto	Bajo
Tiempo de puesta en marcha	2-4 semanas	2-4 meses
Sensibilidad a la temperatura	Baja	Alta
Requerimiento energético	Alto	Bajo a moderado
Recuperación de nutrientes y energía	No	Sí
Modo de tratamiento	Total (dependiendo de las características de alimentación)	Esencialmente, pretratamiento

I.2.3.1 Sistema aerobio-anaerobio

Como se analizó anteriormente, los tratamientos aerobios resultan inviables para tratamiento de aguas porcícolas con altas cargas de materia orgánica, mientras que los tratamientos anaerobios no eliminan eficientemente todos los contaminantes. Por consiguiente, la combinación de ambas tecnologías en un solo sistema llamado híbrido de tratamiento podría permitir obtener las ventajas de ambos tratamientos y un efluente de mejor calidad.

Los sistemas aerobio-anaerobio son un tipo de tecnología híbrida, resultante de la combinación de dos o más tecnologías de tratamientos con el propósito de alcanzar una mayor eficiencia de remoción de contaminantes (Gadipelly *et al.*, 2014). Los sistemas híbridos tienen un menor consumo energético y suelen ser sencillos de operar; además de ser eficientes para la

remoción de nutrientes, tratar altas cargas orgánicas y eliminar contaminantes persistentes como pesticidas y antibióticos (González-Tineo *et al.*, 2020).

Sikosana *et al.* (2019), reportaron el uso de tecnología anaerobia-aerobia, utilizando un reactor UASB (tratamiento anaerobio) y lodos activados (tratamiento aerobio), el cual facilitó el tratamiento de los aerobios debido a que estos retornaban al reactor UASB para ser estabilizados. Al tener dos etapas o secciones, un sistema anaerobio-aerobio permitiría una mayor eliminación de contaminantes, ya que en la sección aerobia se terminaría de eliminar los contaminantes persistentes restantes de la sección anaerobia (Noyola *et al.*, 2013).

En adición, es importante mencionar, es que los sistemas anaerobios tienen bajas eficiencias de eliminación de nitrógeno, ya que los compuestos nitrogenados se degradan pobremente en condiciones anaerobias (González-Tineo *et al.*, 2020). Por tanto, añadir un sistema aerobio podría ayudar a eliminar los compuestos nitrogenados, siendo el oxígeno necesario para que se lleve a cabo la nitrificación (Yin *et al.*, 2018). Adicionalmente, el uso de carriers en estos sistemas puede ayudar a inmovilizar la biomasa en forma de biopelículas. Esta tecnología contribuye al desarrollo de una gran diversidad de microorganismos, además de proveer protección contra agentes tóxicos y mejorar la eliminación de contaminantes (Aguilar-Ruiz *et al.*, 2019).

I.3 Efecto de los parámetros operacionales y condiciones ambientales en las comunidades microbianas.

Las comunidades microbianas pueden verse afectadas por las condiciones ambientales, así como las condiciones operacionales del proceso de biodegradación, tales como la temperatura, el tiempo de retención hidráulica (TRH), carga orgánica, etc. (Daud *et al.*, 2018). Además, el tipo de inóculo y la composición del sustrato puede afectar particularmente a algunas especies como las bacterias hidrolíticas presentes en la comunidad microbiana (Nguyen *et al.*, 2018). La Tabla 5 resume el efecto principal de los parámetros operacionales de los tratamientos biológicos.

Tabla 5. Efecto de los parámetros operacionales sobre los tratamientos biológicos (Adekunle *et al.*, 2015; Bajpaj, 2017; Bi *et al.*, 2020; Daud *et al.*, 2018; Pasalari *et al.*, 2021; Vivanco *et al.*, 2018).

Parámetro	Efecto
Composición del sustrato, factor C: N:S:P	La concentración adecuada de nutrientes favorece el proceso de biodegradación y el correcto desarrollo de los microorganismos. Concentraciones elevadas de algunos nutrientes pueden tener efectos inhibitorios.
Carga orgánica	Al aumentar la carga orgánica se corre el riesgo de acidificación del sistema y, por tanto, inhibir la metanogénesis, provocando inhibición de la digestión anaerobia.
Tiempo de retención hidráulica (TRH)	La reducción del tiempo de TRH favorece la producción de metano, sin embargo, los cambios inadecuados de este parámetro pueden provocar variaciones negativas en la comunidad microbiana.
Temperatura	La temperatura ideal en la digestión anaerobia suele ser mesofílica (32-42°C). Hasta un pequeño deceso o incremento, puede causar alteraciones en las comunidades microbianas y repercutir en la producción de biogás.
Concentración de oxígeno	La cantidad de oxígeno debe ser controlada en todo momento debido a que las arqueas metanógenas son anaerobias estrictas.
pH	Las bacterias tienen pH óptimos y no todas logran adaptarse. En especial, las arqueas metanógenas no logran adaptarse a los cambios de pH. El pH óptimo de la digestión anaerobia es de entre 6.8 y 7.5
Mezclado	El mezclado correcto es importante para lograr que las bacterias entren en contacto con la materia orgánica y puedan llevar a cabo la biodegradación

Los parámetros operacionales dependen de la composición del influente, la temperatura y el tipo de sistema que se está utilizando (Pasalari *et al.*, 2021). Es por ello por lo que deben ajustarse de forma específica y deben ser monitoreados durante todo el proceso.

I.4 Herramientas metagenómicas para el estudio de comunidades microbianas.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos desempeñan el papel principal en los tratamientos biológicos. Más aun, la diversidad de la comunidad microbiana determina el

desempeño y la estabilidad del sistema de tratamiento; encontrándose que, a mayor diversidad en la comunidad microbiana, mayor estabilidad en el sistema (Chen *et al.*, 2017).

Por esta razón, el estudio de la ecología microbiana es fundamental para mejorar la comprensión de las dinámicas de las comunidades microbianas, así como para explicar las interacciones ecológicas; por tanto, es necesario evaluar la diversidad microbiana a través del aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos de las muestras ambientales (Almeida y Martinis, 2018).

Pese a que la mayoría de los microorganismos ambientales no son cultivables, las herramientas metagenómicas permiten la identificación de microorganismos a través de su material genético, haciendo posible la caracterización y el estudio de la composición taxonómica de las comunidades microbianas, así como el estudio de las interacciones y funciones de las comunidades microbianas (Moya, 2017; Yi, 2015).

Una de las técnicas más utilizadas en la investigación microbiológica es la secuenciación masiva de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), la cual ha permitido explorar los genes y los genomas microbianos de forma masiva y paralela, es independiente de métodos de cultivos y requiere poca cantidad de DNA (Greay *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2020). Este proceso se lleva a cabo en cuatro pasos, comenzando por la extracción de DNA, la preparación de librerías, secuenciación y el análisis bioinformático con la respectiva interpretación de resultados (Hernández *et al.*, 2020).

La secuenciación del gen ribosomal 16S es la principal aplicación de esta tecnología en el estudio de la ecología microbiana (Sanz y Köchling, 2019). La subunidad 16S del RNA ribosomal es conocido por ser el blanco universal para la caracterización bacteriana del DNA (Moya, 2017). El tamaño del gen es de aproximadamente 1,500 nucleótidos, tiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que permiten realizar estudios taxonómicos y filogenéticos, y, además, conserva su estructura secundaria, lo cual facilita la comparación de secuencias (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

Aunque los estudios metagenómicos hacen posible la determinación de la estructura de las comunidades microbianas, no permiten conocer si los miembros de la comunidad microbiana están activos, impidiendo establecer la relación entre los microorganismos presentes y la

actividad microbiana; sin embargo, a través de la secuenciación de ARN (conocida como meta transcriptómica), es posible conocer los perfiles de expresión de los microorganismos metabólicamente activos (Maurice *et al.*, 2013).

Esto es así porque el ADN puede ser extraído a través de una célula latente o inactiva, más el ARN, el encargado de conducir los procesos metabólicos, solo puede ser obtenido a partir de células activas; por esta razón, cuando a través del ADN se puede conocer la comunidad microbiana total, a través del ARN o ADN complementario (ADNc) se conoce la comunidad microbiana metabólicamente activa (Argudo *et al.*, 2019; Birrer *et al.*, 2018). El análisis de ARN es una medida indirecta de actividad metabólica ya que, representa a los microorganismos que realizan síntesis proteica a través del conteo de sus ribosomas.

II. HIPÓTESIS

Las comunidades microbianas presentes en las dos secciones que conforman el biorreactor híbrido son distintas, ya que son influenciadas por distintos factores, como los parámetros de operación, las condiciones ambientales, el inóculo, la composición del sustrato, etc. La comunidad microbiana presente en el biorreactor híbrido es distinta a la comunidad microbiana presente en el biorreactor UASB. La comunidad microbiana total (ADN) y la comunidad microbiana metabólicamente activa (ADNc) son diferentes una de la otra debido a que las comunidades microbianas pueden verse afectadas ante la presencia de los contaminantes, los cambios ambientales y otros factores.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Evaluar la comunidad microbiana de un biorreactor híbrido para tratamiento de agua residual porcícola, mediante la correlación de la comunidad presente total vs la comunidad microbiana metabólicamente activa.

III.2 Objetivos específicos

1. Analizar la comunidad microbiana presente en las fases anaerobia y aerobia de un biorreactor híbrido trabajando a alta carga orgánica para el tratamiento de agua residual porcícola mediante la extracción y secuenciación de ADN.

2. Conocer la comunidad microbiana metabólicamente activa presente en las fases anaerobia y aerobia de un biorreactor híbrido para el tratamiento de agua residual porcícola mediante extracción y secuenciación de ARN.

3. Correlacionar el perfil funcional, la microbiota total y el perfil fisicoquímico a lo largo del biorreactor híbrido en sus fases anaerobia y aerobia frente a un sistema UASB para el tratamiento de agua residual porcícola mediante el programa PICRUSt para la predicción del perfil funcional microbiano y a través de análisis de escalamiento multidimensional.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Sistema híbrido aerobio-anaerobio

La Figura 3 muestra el sistema híbrido propuesto, el cual consiste en dos secciones. La primera sección corresponde a la etapa anaerobia, la cual funciona como un reactor UASB; la segunda sección correspondo a un reactor aerobio de lecho empacado. El biorreactor híbrido tuvo un volumen útil de 2.5 L, un rango de flujo de 3.01 ± 0.43 L día⁻¹ y un tiempo de retención hidráulica de 0.65 ± 0.07 días.

La sección anaerobia del biorreactor fue inoculada con 800 mL de lodo granular anaerobio. Para mantener la temperatura constante en esta sección, se utilizó un serpentín de agua caliente externo ($37 \pm 0.2^\circ\text{C}$). El inóculo fue obtenido de un reactor UASB de las instalaciones de la planta de tratamiento de una cervecería (Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, Ciudad de México).

Por otro lado, el inóculo de la sección aerobia fue obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en Obregón, Sonora, México. Esta sección fue rellena con anillos de polietileno las siguientes dimensiones: 3 cm de diámetro, 3 cm de altura y una densidad de 77.8 g L⁻¹.

A su vez, se operó un reactor convencional UASB, con un rango de flujo de 3.11 ± 0.34 L día⁻¹ y un tiempo de retención hidráulica de 0.68 ± 0.11 días. Tanto el biorreactor híbrido como el UASB fueron alimentados con agua residual porcícola proveniente de una granja ubicada en Ciudad Obregón, Sonora, alcanzando una carga orgánica final de 11.53 ± 0.087 kg DQO/m³. día.

IV.2 Muestreo de biomasa

Se tomaron muestras de ambas secciones del biorreactor híbrido, tanto del lodo granular de la sección anaerobia, así como de la biomasa aerobia obtenida de los anillos de polietileno. También se muestrearon el influente y la biomasa anaerobia del reactor UASB. Las muestras se tomaron por triplicado y fueron mantenidas en refrigeración a 4°C hasta su posterior manejo.

Tanto el sistema UASB como el biorreactor híbrido estaban en estado estable durante el muestreo.

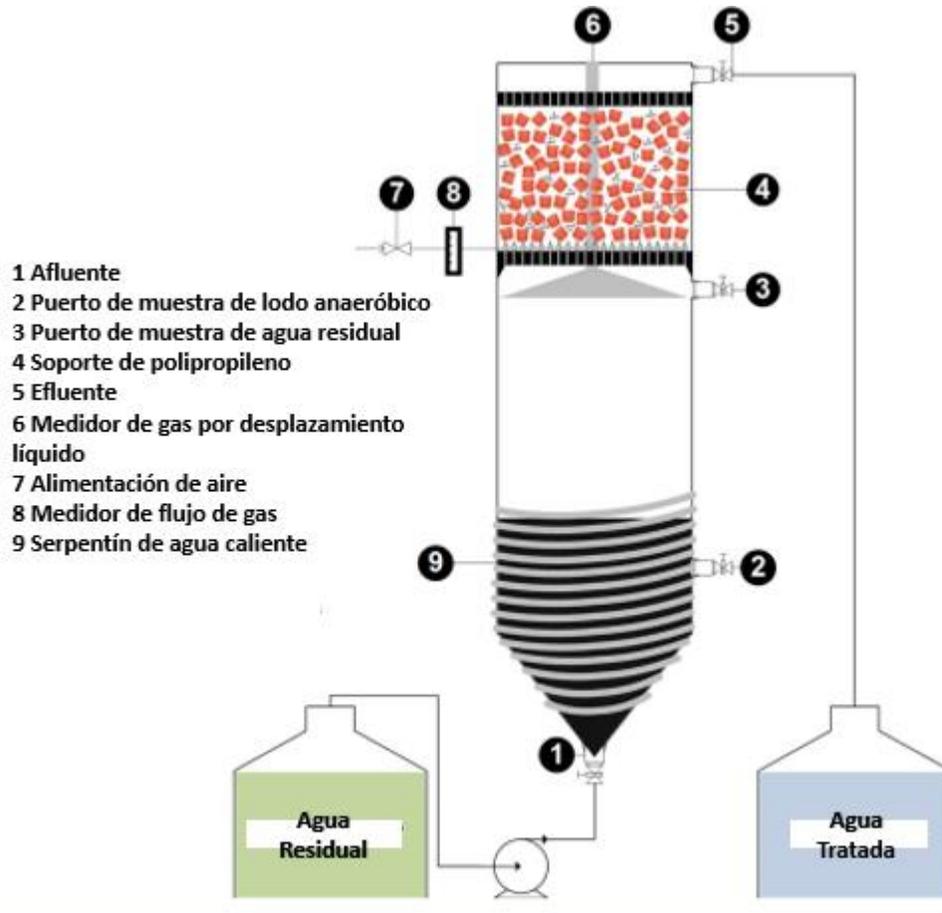


Figura 3. Diseño del biorreactor híbrido aerobio-anaerobio (González-Tineo *et al.*, 2020).

IV.3 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc

El ADN fue extraído a partir de 0.1-0.15 g de las muestras mediante el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado mediante un fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) usando un ensayo de alta sensibilidad (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

El ARN fue extraído a partir de 0.1-0.15 g de muestra mediante el kit RNeasy PowerSoil (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó la enzima DNease (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) para remover por completo el ADN. Las muestras de ARN fueron probadas a través de PCR para asegurar que no hubiera restos de ADN. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa a ADNc mediante GoScript Reverse Transcription Mix (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante (Aguilar-Rangel *et al.*, 2020).

IV.4 Amplificación por PCR, construcción de librerías y secuenciación 16S rRNA

Se amplificó la región hipervariable V4 del gen ribosomal 16S utilizando los primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), los cuales son universales para los dominios Archaea y Bacteria respectivamente (Caporaso *et al.*, 2011). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ L (10 ng de ADN o ADNc, 1 \times buffer de PCR, 0.4 μ M de cada primer, 800 μ M de dNTP mix, 5% de DMSO, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U de ADN polimerasa ExTaq (Takara Bio Inc). El proceso de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s; hibridación a 52°C por 40 s y extensión a 72°C por 90s (Aguilar-Rangel *et al.*, 2020). La extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 10 min. Los amplicones 16s rRNA obtenidos fueron purificados con Agencourt AMPureXP PCR purification system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Por último, las muestras fueron enviadas a secuenciar en la plataforma MiSeq de Illumina (Macrogen, Corea).

IV.5 Análisis bioinformático y estadístico

Las secuencias en crudo fueron depositadas en NCBI BioProject con número de acceso PRJNA 824521. Las secuencias fueron analizadas mediante phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) en el ambiente RStudio (v.1.4.1106) de la plataforma R. Se utilizó la tubería de datos DADA2 para llevar a cabo el demultiplexeo y la filtración de secuencias (Callahan *et al.*, 2016).

Se utilizó la base de datos Silva v.138 database (www.arb-silva.de/) para realizar la clasificación taxonómica. Se obtuvo la abundancia relativa de los principales géneros encontrados en las muestras y se realizó la evaluación de la alfa diversidad basado en la

abundancia relative de los géneros más abundantes mediante los índices de Shannon-Wiener e Inverso de Simpson. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las muestras entre los índices de diversidad, seguido por la prueba de comparaciones múltiples Duncan mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) (Copyright © [1999-2000] SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks or trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

En el caso de la beta diversidad, se calculó mediante una matriz de disimilaridad de Bray Curtis, la cual fue visualizada mediante un análisis de componentes principales (PCoA). Para comparar las distancias entre las muestras, se realizó un análisis de permutaciones múltiples (PERMONOVA).

La predicción de funciones metabólicas basadas en las tablas de variantes de secuencias de amplicón (ASVs) normalizadas se llevaron en PICRUST2 (v.2.1.4 beta) (Douglas *et al.*, 2020) utilizando la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) (Kanehisa y Soto, 2000). Para visualizar los resultados, se realizó un mapa de calor en RStudio usando la función y la librería pheatmap.

Por último, se realizó un análisis multivariable con el software Primer E (PRIMER-E v. 6.1.18, Plymouth, UK). Las muestras fueron ordenadas mediante un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) no métrico basado en su número de ASVs. Las variables abióticas de los biorreactores fueron correlacionadas a las tendencias de diversidad, seguido por los diferentes grupos microbianos a través de la ordenación, usando un análisis BIO-ENV (biota-environment). Los resultados obtenidos fueron evaluados con BEST (Maza-Márquez *et al.*, 2016).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron un total de 2,058,192 secuencias en crudo durante el proceso de secuenciación. Después de análisis de control de calidad se recuperaron el 72% de las secuencias, las cuales se agruparon en 7,398 ASVs. El rango de secuencias no quiméricas obtenidas por muestra fue de 131,509 a 226,033, como se muestra en la Tabla 6. Las secuencias quiméricas fueron eliminadas en la pipeline DADA2. Se realizaron curvas de rarefacción para confirmar que la comunidad microbiana fue correctamente representada por los datos obtenidos de la secuenciación (Figura 4).

Tabla 6. Número de secuencias 16S ARNr obtenidas por NGS.

Muestra	Secuencias en crudo	Secuencias filtradas	Secuencias no quiméricas
Influyente (ADN)	302,139	271,172	226,033
Influyente (ADNc)	264,302	233,496	188,232
Biorreactor sección aerobia (ADN)	204,405	184,202	145,589
Biorreactor sección aerobia (ADNc)	191,519	169, 199	131,509
Biorreactor sección anaerobia (ADN)	292,142	260, 592	222,466
Biorreactor sección anaerobia (ADNc)	228,128	197, 315	172,929
UASB (ADN)	308, 133	275,615	219,372
UASB (ADNc)	267,424	237, 119	181,593
Total	2,058,192	1,888,641	197,698

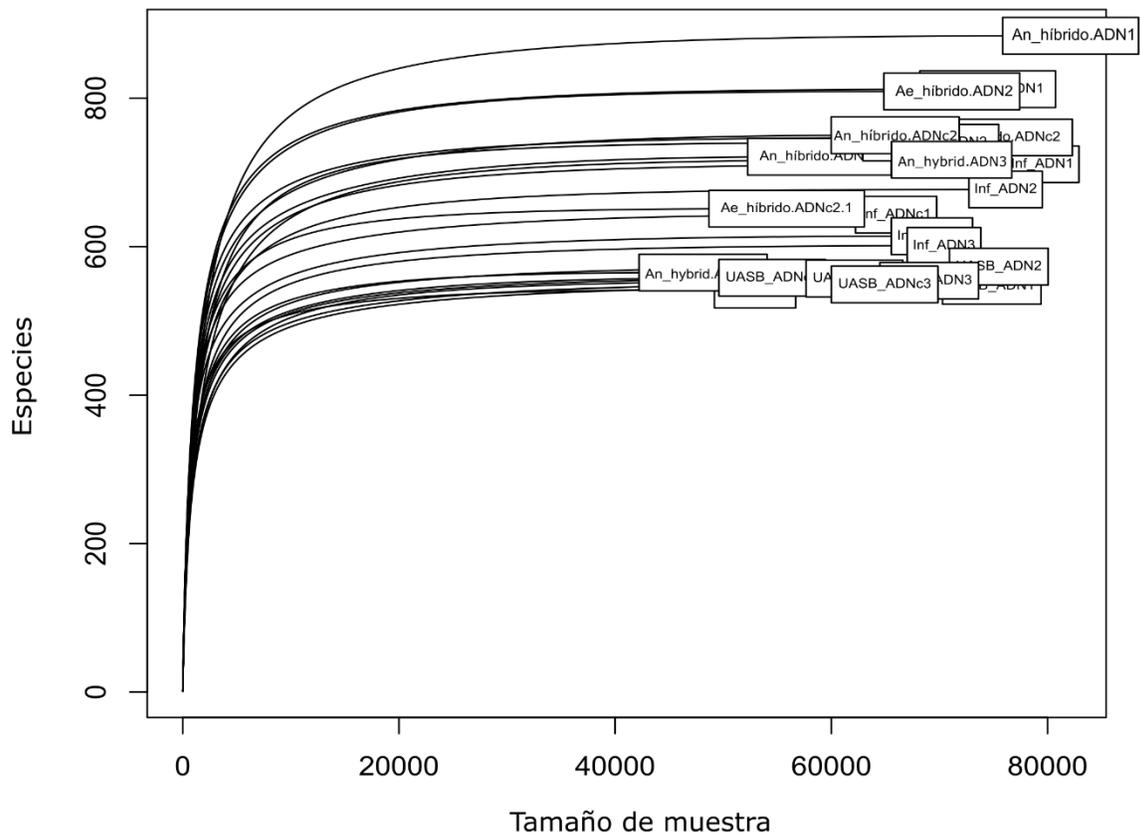


Figura 4. Curvas de rarefacción producidas del análisis de secuenciación.

V.1 Alfa diversidad

La alfa diversidad nos permite estimar la estructura de una comunidad microbiana en consideración a su riqueza y uniformidad (Willis, 2019). Es posible definir riqueza como la cantidad de especies que se encuentran en una comunidad, mientras que la uniformidad hace referencia a la proporción de cada especie dentro de una comunidad; tanto la riqueza como la uniformidad son indicadores de diversidad microbiana (Kim *et al.*, 2017).

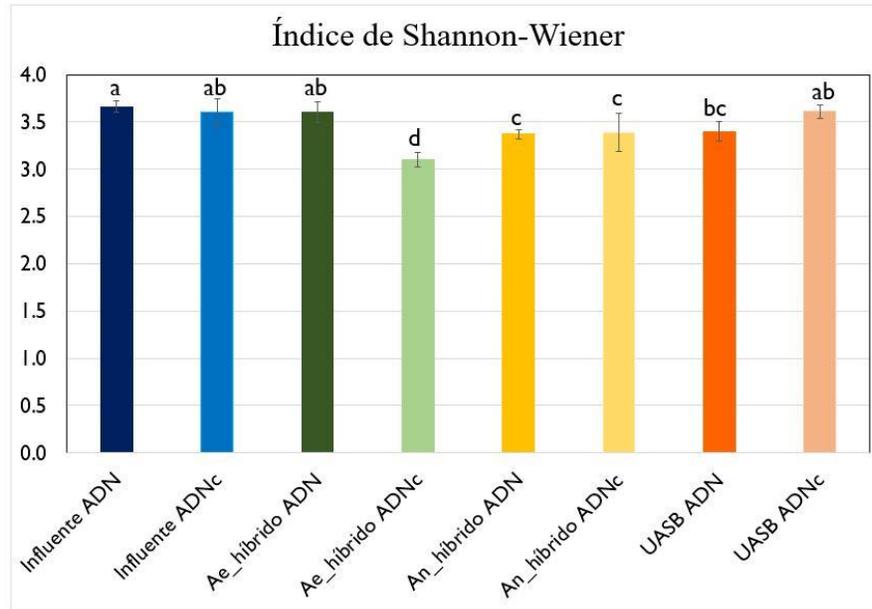


Figura 5. Índice de Shannon-Wiener. Los subíndices con diferente letra representan diferencias significativas ($p > 0.05$). El eje Y representa el valor de Índice de Shannon-Wiener.

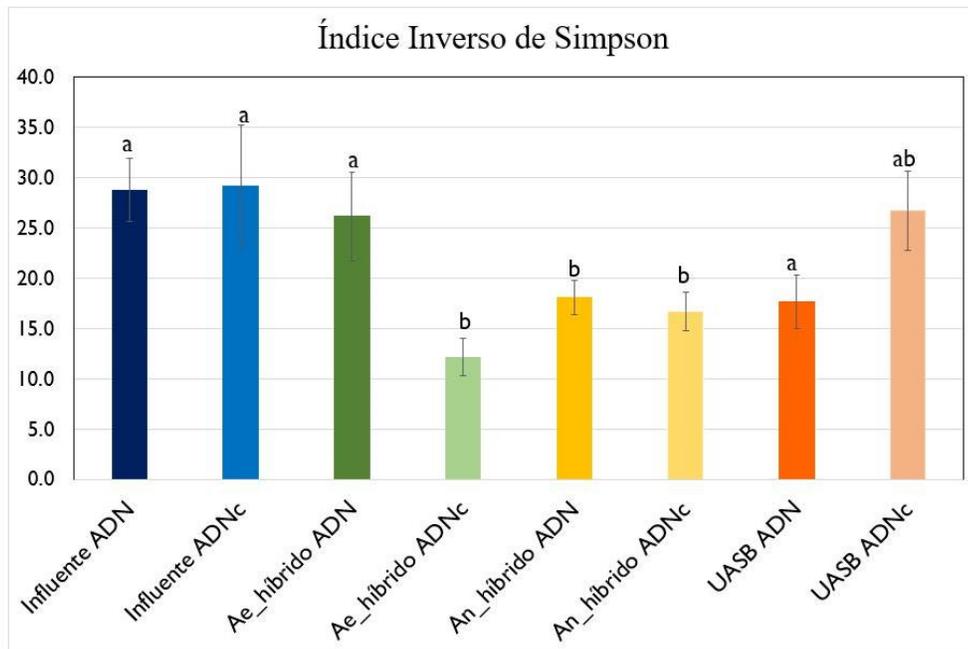


Figura 6. Índice Inverso de Simpson. Los subíndices con diferente letra representan diferencias significativas ($p > 0.05$). El eje Y representa el valor de Índice Inverso de Simpson.

Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados de los análisis de alfa diversidad evaluados a través de los índices de Shannon-Wiener e Inverso de Simpson. Las muestras fueron etiquetadas como Influyente, Ae_híbrido (sección aerobia del biorreactor híbrido), An_híbrido (sección anaerobia del biorreactor híbrido) y UASB, respectivamente. Las etiquetas también fueron clasificadas como ADN o ADNc.

Los valores obtenidos del índice de Shannon-Wiener fueron similares en la mayoría de las muestras, salvo por las muestras de Ae_híbrido ADNc, las cuales obtuvieron un valor significativamente menor (3.10 ± 0.08) ($p > 0.05$). Los valores obtenidos para el índice inverso de Simpson también reflejan una menor diversidad para el caso de Ae_híbrido ADNc (12.11 ± 1.86) cuando se compara con el resto de las muestras, incluso con las de Ae_híbrido ADN. Lo anterior podría sugerir que hay una mayor proporción de microorganismos inactivos en la comunidad microbiana de esta muestra. Debido a que las condiciones en esta etapa son aerobias, algunos de los microorganismos presentes podrían no poder desarrollarse bajo las condiciones establecidas en esta etapa, ya que los parámetros operacionales y la composición del influente tienen un impacto significativo sobre la organización y estructura de las comunidades microbianas (Chen *et al.*, 2017).

También se encontraron diferencias significativas entre la comunidad total y la comunidad metabólicamente activa en el reactor UASB, donde el valor del índice inverso de Simpson en las muestras de ADN fue de 17.68 ± 2.66 , mientras que en las muestras de ADNc se encontró un valor de 26.65 ± 3.94 , indicando un incremento de la diversidad en la comunidad metabólicamente activa. Esto también podría indicar mayor uniformidad en la proporción el número de especies presentes en la comunidad metabólicamente activa. Un caso similar fue reportado por Wang *et al.* (2018) cuando comparó la riqueza y diversidad de comunidades microbianas a nivel ADN y ARN.

En el caso del influente, no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de los índices en las muestras de ADN y ADNc, implicando que ambas comunidades microbianas muestran diversidad y uniformidad similares. Podría esperarse que el influente posea mayor cantidad de especies microbianas porque los microorganismos no han sido expuestos a las condiciones de los parámetros operacionales de los biorreactores. Rocha *et al.* (2017) reportó que el influente de una planta de tratamiento de agua residual tenía mayor

diversidad que el efluente debido al tratamiento de agua residual por el que pasaron los microorganismos.

V.2 Abundancia relativa

Los géneros con mayor abundancia relativa encontrados en las muestras se muestran en la Figura 7. Como puede apreciarse en la figura, el género de arqueas *Methanosaeta* está presente en todas las muestras, sin embargo, su mayor abundancia relativa (22% ADN, 16% ADNc) se encontró en el reactor UASB. El género *Methanosaeta* suele encontrarse comúnmente en digestores anaerobios y lleva a cabo la metanogénesis por vía acetoclástica, la cual suele ser una vía más eficiente que la vía hidrogenotrófica; *Methanosaeta* tiende a predominar en digestores anaerobios bajo condiciones no estresantes, con bajas concentraciones de ácidos grasos volátiles y amonio libre (Capson-Tojo *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020).

En el caso de las muestras Ae_híbrido y An_híbrido, se pueden observar diferencias en la abundancia relativa de *Methanosaeta* entre las muestras de ADN y ADNc, indicando una menor abundancia de este género en la comunidad metabólicamente activa. En el caso de Ae_híbrido, se puede ver un decremento de 9 a 1.5% de la abundancia relativa; esto puede explicarse debido a que estos metanógenos no pueden desarrollarse bajo condiciones aerobias y sólo pueden sobrevivir dentro de la comunidad anaerobia en micro nichos que podrían formarse en las biopelículas. Además de *Methanosaeta*, se encontró el género de metanógenas *Methanobacterium*. Sin embargo, se encontró menor abundancia relativa de este género en todas las muestras. La mayor abundancia de *Methanobacterium* se encontró en las muestras de ADNc del reactor UASB, con una abundancia relativa del 4%.

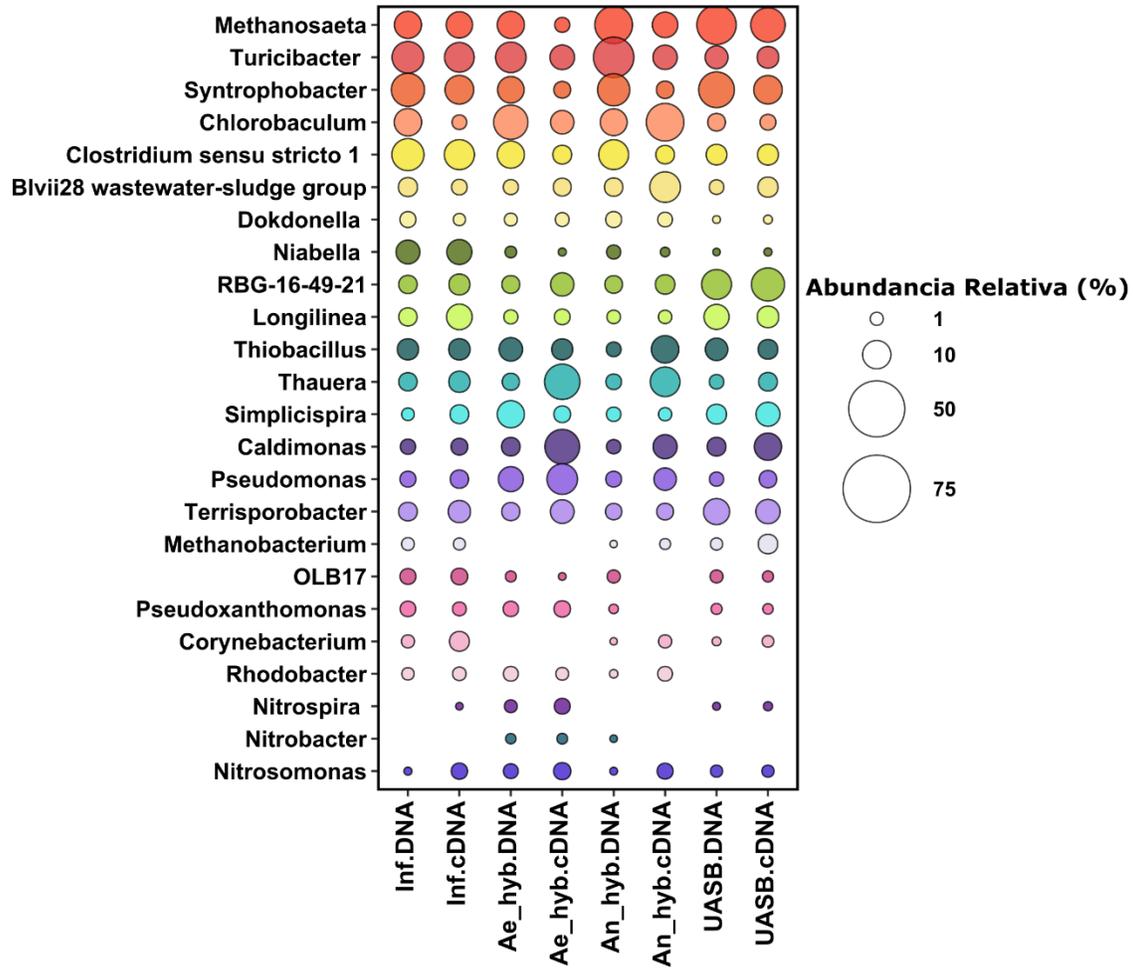


Figura 7. Abundancia relativa de los géneros más abundantes en las muestras.

Respecto a la diversidad del dominio Bacteria, la mayoría de los géneros encontrados en las muestras pertenecen a los filos Proteobacteria y Firmicutes. Estos filos juegan un rol importante en los digestores anaerobios, puesto que la mayoría de los microorganismos acidógenos reportados en la digestión anaerobia, pertenecen a estos grupos (Lim *et al.*, 2020). Además, ha sido reportado que las bacterias del filo Firmicutes degradan los ácidos grasos volátiles y participan en el catabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos (Lourinho *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2022). La predominancia de los filos Proteobacteria y Firmicutes en las comunidades microbianas también de digestores anaerobios que tratan agua residual porcícola ha sido reportada previamente por Han *et al.* (2019), además de que se estima que estos filos en

conjunto con otros microorganismos tienen un papel principal en la fermentación anaerobia (Zhao *et al.*, 2022).

Se encontró la presencia de bacterias acetogénicas en todas las muestras, como *Clostridium sensu stricto* 1 y *Syntrophobacter*. La presencia de estas bacterias homoacetogénicas es realmente importante, ya que producen acetato (precursor de la metanogénesis) a partir de H₂ y CO₂. Además, ayudan a mantener concentraciones adecuadas de ácidos grasos volátiles, los cuales en altas concentraciones inhiben la metanogénesis y por ende el proceso de digestión anaerobia (Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

El género *Terrisporobacter* también asociado con la producción de ácido acético mediante la fermentación de carbohidratos (Liu *et al.*, 2021), se encontró en mayor abundancia relativa en las muestras del reactor UASB (8% ADN, 6% ADNc), muestras en las que también el género de *Methanosaeta* tiene mayor abundancia relativa. Debido a la dependencia de *Methanosaeta* por el ácido acético, la superior abundancia relativa de *Terrisporobacter* podría indicar una relación mutualista entre ambos. Las relaciones sintróficas entre microorganismos son de gran importancia en la digestión anaerobia, ya que estas determinan el éxito y la estabilidad del proceso (Pasalari *et al.*, 2020).

Se encontraron también, bacterias asociadas a procesos de nitrificación y desnitrificación en la mayoría de las muestras. Géneros como *Thauera*, *Niabella*, *Dokdonella*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodobacter* están relacionadas con procesos de remoción de nitrógeno (Wang & He, 2020; Bucci *et al.*, 2020; Pishgar *et al.*, 2019; Fuka *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2015). La mayor abundancia relativa de estos géneros microbianos se encontró en las muestras Ae_híbrido (32% ADN, 42% ADNc). La presencia de estos géneros bacterianos puede contribuir a la remoción de nitrógeno en el sistema híbrido, aunque algunos de ellos sólo lleven a cabo la nitrificación heterótrofa, la cual ha demostrado ser menos eficiente en la nitrificación autótrofa (Gómez-Silvan *et al.*, 2014).

No obstante, los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira* y *Nitrobacter* son los géneros principalmente reportados que llevan a cabo la nitrificación en sistema de tratamiento de aguas residuales (Zhao *et al.*, 2018). Por tanto, se buscó la presencia de estos géneros entre los ASVs detectados en este estudio. Los tres géneros nitrificantes se encontraron en las muestras

Ae_híbrido, con una abundancia relativa del 4% en las muestras de ADN y 5% en las de ADNc. En el caso de las muestras UASB, se encontraron los géneros Nitrosomonas y Nitrospira, con una abundancia relativa del 0.9% en las muestras de ADN y 1% en las de ADNc. Usualmente, estos géneros bacterianos se encuentran en bajas abundancias relativas los sistemas de tratamiento de aguas ($\leq 1\%$), sin embargo, juegan un papel principal en la remoción de nitrógeno.

En las muestras de An_híbrido, el género Chlorobaculum fue el que se encontró en mayor abundancia (abundancia relativa del 20% ADNc). Estos microorganismos son oxidadores de sulfuro y se conoce que también tienen un papel protector contra el oxígeno en el ambiente, ayudando a mantener las condiciones anaerobias (Acevedo *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). En contraste, la abundancia de Chlorobaculum en las muestras del reactor UASB fue solamente de 3% en las muestras de ADN y 2% en las de ADNc.

Por último, es importante resaltar que la abundancia relativa de algunos géneros varió en algunos casos al comparar las muestras de ADN y ADNc. Por ejemplo, en la Figura 7 podemos ver que la abundancia relativa de Clostridium sensu stricto1 en las muestras de Ae_híbrido, tuvo una caída del 9% al 3% en las muestras de ADNc. Las bacterias del género Clostridium son estrictamente anaerobias, y no pueden proliferar bajo altas concentraciones de oxígeno disuelto; aun así, la presencia de este género en la comunidad aerobia puede estar atribuida a la estratificación de biomasa, creando condiciones anaerobias en las cuales puedan proliferar estas bacterias (Brasca *et al.*, 2022). Además, las bacterias del género Clostridium pueden esporular.

También es notorio que algunos géneros como Pseudoxanthomonas, Nitrobacter y OLB17 (género no clasificado del filo Acidobacteria) se encuentran en las muestras An_híbrido ADN, pero no en las muestras An_híbrido ADNc, sugiriendo que no forman parte de la comunidad microbiana metabólicamente activa del biorreactor híbrido. Resultados similares se han reportado en otros estudios cuando se comparan los amplicones derivados de ADN y ARN de marcadores genéticos para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas en procesos de digestión anaerobia.

DeVrieze *et al.* (2018), reportaron diversidad similar de las comunidades total y metabólicamente activa en la investigación de 48 plantas de digestión anaerobia, pero se encontraron diferencias importantes en la composición de las comunidades. De acuerdo con lo

reportado, las diferencias en la composición de las comunidades total (ADN) y metabólicamente activa (ARN) puede ser atribuida al impacto de los parámetros operacionales. Así también, en un estudio realizado por Wang *et al.* (2020) sobre la sucesión de la comunidad microbiana durante el composteo de residuo anaerómicamente digerido, se encontró que los parámetros operacionales tienen una fuerte influencia sobre la comunidad microbiana metabólicamente activa.

V.3 Beta diversidad

Los análisis de beta diversidad permiten evaluar las similitudes y disimilitudes entre las comunidades microbianas. Los resultados pueden visualizarse en la Figura 8, la cual muestra un análisis de componentes principales basado en la distancia de Bray Curtis.

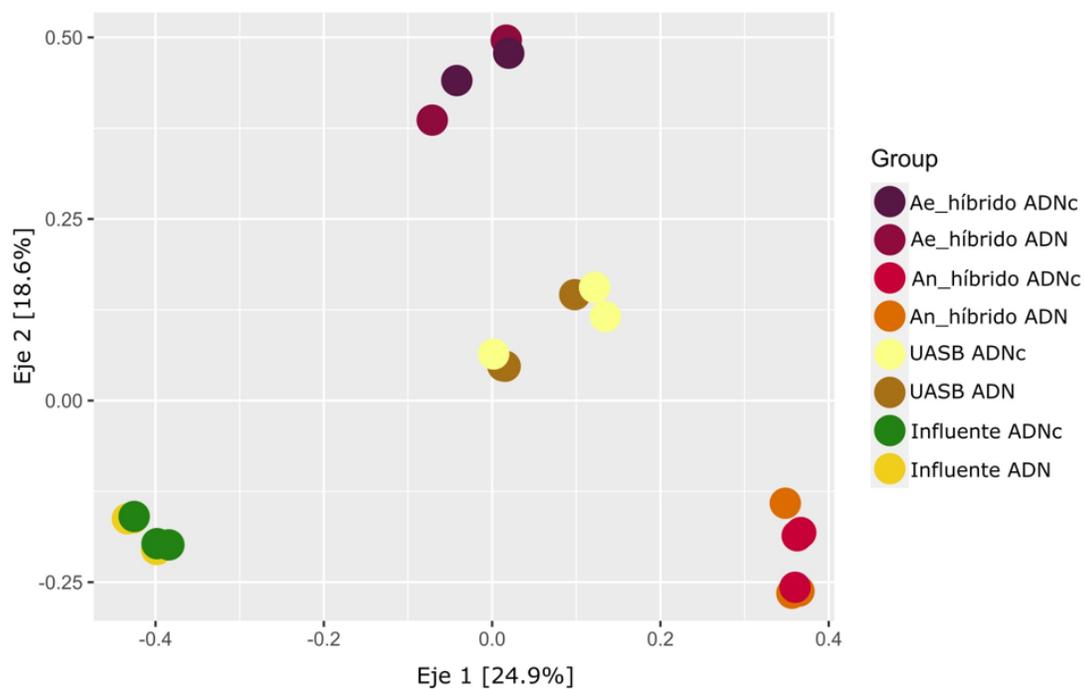


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCoA) utilizando una matriz de distancias calculada con el índice de Bray-Curtis.

La Figura nos muestra una variabilidad del sistema del 43.5%. El primer eje del gráfico muestra un 24.9% de la variación de los datos, mientras que el segundo eje muestra un 18.6% de la variación total del sistema evaluado. Es posible notar que se forman cuatro clústeres o grupos en el gráfico, correspondientes a las cuatro diferentes fuentes de muestra que se tienen. Cada una de las muestras se agrupó dentro de su respectivo grupo, lo cual permite hacer un análisis comparativo entre los distintos grupos de las muestras.

La cercanía de las muestras de ADN y ADNc dentro de cada clúster en la ordenación indica que hay gran similitud entre ellos, mostrando que no hay diferencias significativas entre la estructura de la comunidad microbiana total y de la comunidad metabólicamente activa.

La distancia entre las muestras de las dos etapas del biorreactor híbrido sugiere que hay grandes diferencias entre estas comunidades microbianas, indicando que, aunque pertenecen al mismo biorreactor, no serán necesariamente parecidas. Lo anterior podría estar atribuido a que las diferentes condiciones establecidas en las etapas del biorreactor pueden influenciar sobre la estructura de las comunidades microbianas.

Las diferencias en las comunidades microbianas pueden estar influenciadas por el origen de la muestra, las diferentes características ambientales a los que los microorganismos están expuestos y a los nutrientes disponibles en cada ambiente muestreado (Nguyen *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Shi *et al.* (2021) se evaluaron los cambios en la estructura y dinámicas de las comunidades microbianas de un tratamiento de agua residual porcícola compuesto por tres etapas (anaerobia/aerobia/anóxica). Las tres etapas presentaron diferentes características y condiciones, y los resultados mostraron que la composición de la comunidad microbiana cambió a lo largo del tratamiento.

También es posible observar la distancia entre las comunidades de las muestras UASB y An_híbrido. Debido a que la etapa anaerobia del biorreactor híbrido está diseñada para funcionar como un reactor UASB y ambos fueron inoculados con el mismo lodo, así como alimentados con la misma agua residual, se esperaba que las comunidades microbianas de estos reactores fueran parecidas. Sin embargo, nuestros los resultados obtenidos revelan que hay disimilitudes entre ellos. Posiblemente, la configuración del proceso inflencie de forma importante las comunidades microbianas (Chen *et al.*, 2017); específicamente, la sección aerobia del sistema

híbrido puede influir en la sección anaerobia, provocando diferencias entre las comunidades del reactor UASB e híbrido, a pesar de haber sido alimentadas con el mismo influente. Aunque leves, las diferencias en los parámetros de operación entre ambos reactores también pueden influenciar a las comunidades microbianas, que, en consecuencia, presentarán disimilitudes.

V.4 Predicción de las funciones metabólicas

La predicción de las funciones metabólicas de las comunidades microbianas presentes en las muestras se llevó a cabo mediante la base de datos KEGG usando la herramienta PICRUSt2. Las principales funciones metabólicas encontradas se muestran en la Tabla 7. La abundancia de las veinte principales funciones encontradas se visualiza en el mapa de calor (Figura 9).

Entre las reacciones principales, se encuentran algunas rutas relacionadas a la síntesis y degradación de metabolitos de crecimiento, como los aminoácidos. Además, se encontró el metabolismo del ácido dibásico ramificado c-5 el cual está relacionado con la acetogénesis (Ijoma *et al.*, 2021).

Según la prueba de Duncan, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de las siguientes rutas: quimiotaxis bacteriana, biosíntesis de vancomicina, biosíntesis de valina, leucina e isoleucina, y del ensamblaje flagelar. Se formó un clúster separado (UASB_ADN, Ae_híbrido ADN y Ae_híbrido ADNc) con las muestras que presentaron diferencias significativas en la abundancia de las reacciones mencionadas previamente (Figura 8). Se puede notar que, en el clúster, las reacciones con mayor abundancia aparecen representadas con colores azul intenso, en comparación al resto de las muestras, cuya abundancia está representada con colores más claros.

En el caso de la quimiotaxis bacteriana, se encontró que esta reacción fue significativamente más abundante en las muestras Ae_híbrido ADNc. La quimiotaxis bacteriana es un mecanismo mediante el cual las bacterias mudan de un medio altamente contaminado a uno menos contaminado o tóxico (Karmakar, 2021). Puede contribuir a mejorar las relaciones simbióticas entre microorganismos y ayudarles a adherirse a distintas superficies, además de ser un mecanismo importante para la formación de biopelículas y biodegradación de contaminantes orgánicos (Shukla *et al.*, 2014; Stocker y Seymour, 2012).

Tabla 7. Principales reacciones microbianas.

KEGG Nivel-1	KEGG Nivel-2	KEGG Nivel-3
Metabolismo	Metabolismo de terpenoides y policétidos	Biosíntesis de ansamicinas
	Motilidad celular	Quimiotaxis bacteriana
	Metabolismo de terpenoides y policétidos	Biosíntesis de vancomicina
	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina
	Metabolismo de otros aminoácidos	Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato
	Metabolismo y biosíntesis de glicano	Biosíntesis de peptidoglicano y CoA
	Metabolismo de cofactores y vitaminas	Biosíntesis de CoA pantotenato
	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácido graso
	Procesamiento de información genética	Biosíntesis de aminoacil ARNt
	Metabolismo de otros aminoácidos	Metabolismo D-alanina
	Replicación y reparación	Reparación de errores de apareamiento
	Metabolismo carbohidratos	Metabolismo del ácido dibásico ramificado C5
	Metabolismo de cofactores y vitaminas	Reserva de carbono por folato
	Traducción	Ribosoma
	Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo de alanine, aspartate y glutamato
	Metabolismo de cofactores y vitaminas	Metabolismo de tiamina
	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis de isoleucina
	Crecimiento y muerte celular	Ciclo celular Caulobacter
	Motilidad celular	Ensamblaje flagelar
	Metabolismo energético	Fijación de carbono en organismos fotosintéticos

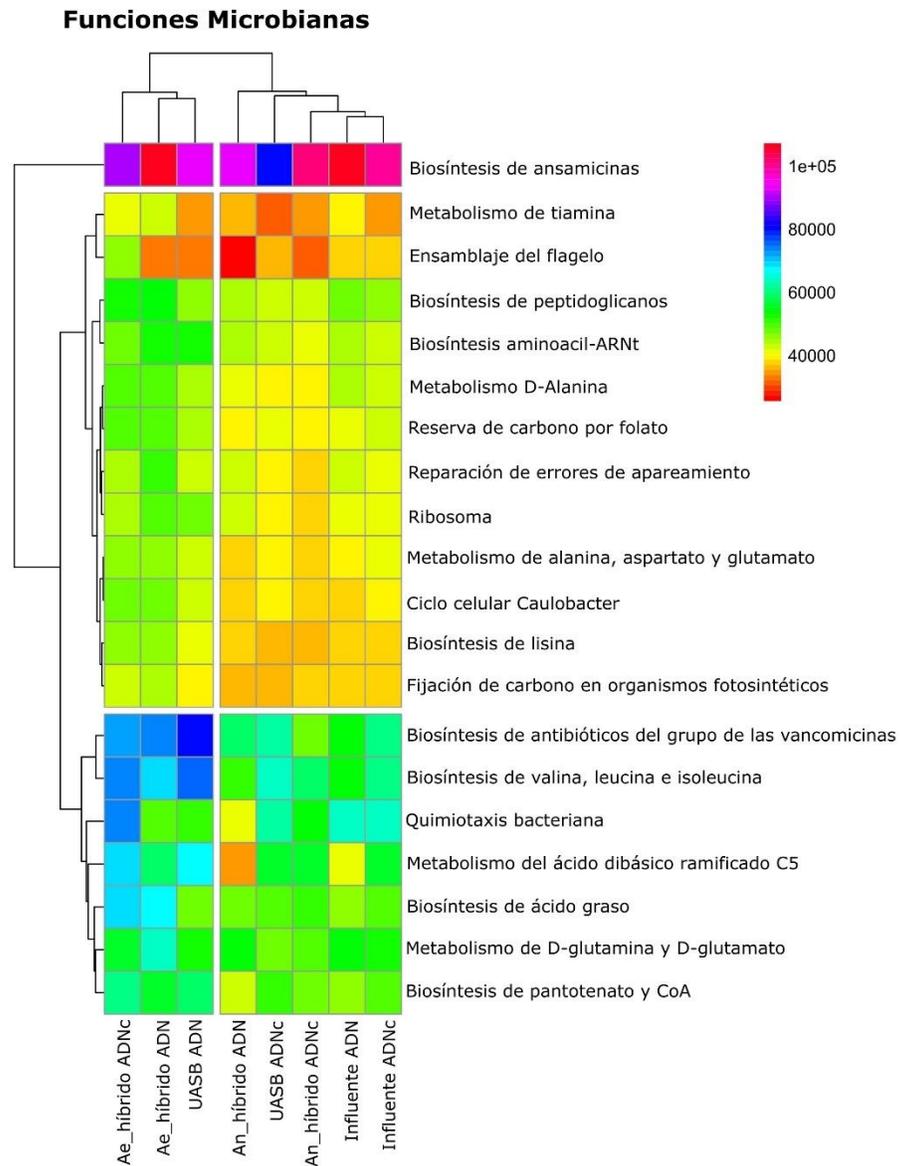


Figura 9. Predicción de las funciones microbianas. La escala de colores muestra que tan abundante o frecuente es la función metabólica en la muestra. Los colores más intensos (rojo-violeta) representan mayor abundancia, mientras que los colores menos intensos (amarillo-naranja) representan menor abundancia de la función metabólica. El clúster de la izquierda hace referencia a que las muestras agrupadas son significativamente diferentes ($p > 0.05$) al resto de las muestras.

En general, la migración de microorganismos se puede dar en la búsqueda de la concentración más alta de alguna sustancia química en específico, la cual puede ser una concentración favorecedora de nutrientes o sustancias que funciona como señales en interacciones con otros organismos. Puesto que la sección aerobia del biorreactor híbrido está empacada con anillos de polietileno para promover la formación de biopelículas, es posible que el aumento en la abundancia de funciones relacionadas con la quimiotaxis esté relacionado con estos hechos.

Finalmente, al comparar las muestras UASB y An_híbrido ADNc, no se encontraron diferencias significativas. En la imagen es posible ver coloraciones similares en la abundancia de las funciones metabólicas encontradas. En contraste, las muestras UASB ADN tenían una abundancia significativamente superior en funciones relacionadas a la biosíntesis de vancomicina y ansamicinas y algunos aminoácidos, al compararse con las muestras An_híbrido ADN.

La abundancia de las funciones metabólicas relacionadas con la biosíntesis de antibióticos está representada por los colores más intensos de la escala, como podemos notar en la imagen. La biosíntesis de ansamicinas aparece en un tono violeta y rojo para las muestras agrupadas en el clúster, mientras la abundancia de biosíntesis de antibióticos del grupo de las vancomicinas aparece en azul intenso. Estas funciones están relacionadas con genes de biosíntesis de antibióticos, los cuales están relacionados con mecanismos de protección contra antibióticos (Rastegari, 2019).

V.5 Influencia de los parámetros fisicoquímicos sobre las comunidades microbianas

Las Figuras 10a y 10b muestran los gráficos de escalamiento multidimensional con los resultados de la correlación entre los parámetros y la influencia de algunos géneros microbianos en las comunidades microbianas. La distancia entre los vectores indica que las variables que representan tienen tendencias similares, por tanto, la reducción de distancias entre dos vectores significa que tienen tendencias similares.

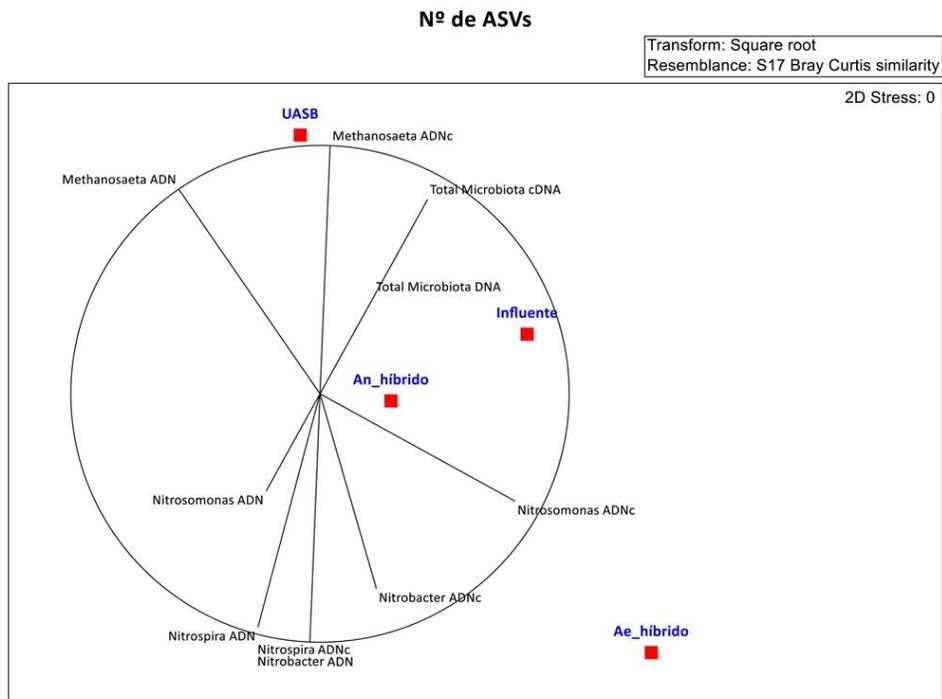
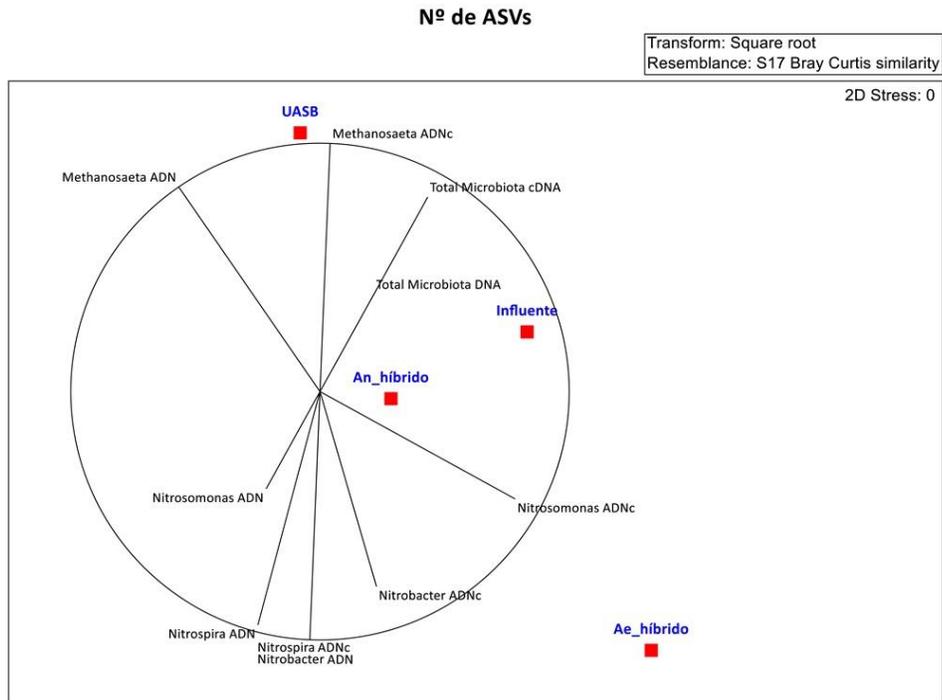


Figura 10a y 10b. Análisis de escalamiento multidimensional. Influencia de los parámetros físicoquímicos sobre las comunidades microbianas evaluadas. En ambas figuras se presentan los cuatro tipos de muestra evaluados en el mismo orden, el cual está basado en el número de ASVs encontrados en cada una de ellas.

Las Figuras muestran una correlación entre el número de ASVs y la concentración de DQO. Tanto la comunidad total (ADN) como la comunidad metabólicamente activa (ADNc) están correlacionadas a la concentración de DQO, de lo cual se puede inferir que hay una correlación entre los nutrientes disponibles y la diversidad microbiana (representada por el número de ASVs). El radio de concentración de DQO y nitrógeno ha sido reportado como un factor clave en el desarrollo de los microorganismos, es decir, una mayor cantidad de nutrientes disponibles puede beneficiar el este crecimiento y desarrollo de más tipos de microorganismos (Shuka *et al.*, 2021). Lo anterior puede visualizarse en las Figuras 10a y 10b, donde el influente posee mayor concentración de DQO y mayor número de ASVs de las comunidad total y metabólicamente activa.

También se observa una correlación positiva entre el género bacteriano Nitrosomonas y la concentración de nitritos, tanto a nivel ADN como ADNc. Puesto que Nitrosomonas produce nitritos a partir del amonio, se espera esperar mayor concentración de nitritos en la mayor diversidad productoras de nitrito.

No obstante, no se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros operacionales evaluados y las comunidades microbianas. Se realizó un análisis BEST para determinar los valores de correlación entre las variables (valor estadístico Rho de -0.05), obteniéndose un valor negativo y cercano a 0, lo cual indica mala significancia. Por esta razón, análisis no puede explicar la correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la diversidad de las comunidades microbianas evaluadas. Es importante destacar que algunos factores además de los parámetros operacionales, como el inóculo y las condiciones ambientales donde los microorganismos se desarrollan, parecen influir sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas (Nguyen *et al.*, 2018).

Por último, en la Figura 11 se presenta un análisis MDS que permite ver la correlación de los géneros encontrados en mayor abundancia en las diferentes comunidades microbianas evaluadas. Es posible notar que en el caso de An_híbrido ADN, Methanosaeta, Syntrophobacter y OLB17 parecen tener mayor influencia; pero en las muestras de An_híbrido ADNc, se observa mayor influencia de bacterias desnitrificantes como Pseudomonas y Thauera. La distancia entre estas dos muestras indica que son distintas una de la otra, revelando diferencias entre la comunidad total y la comunidad metabólicamente activa.

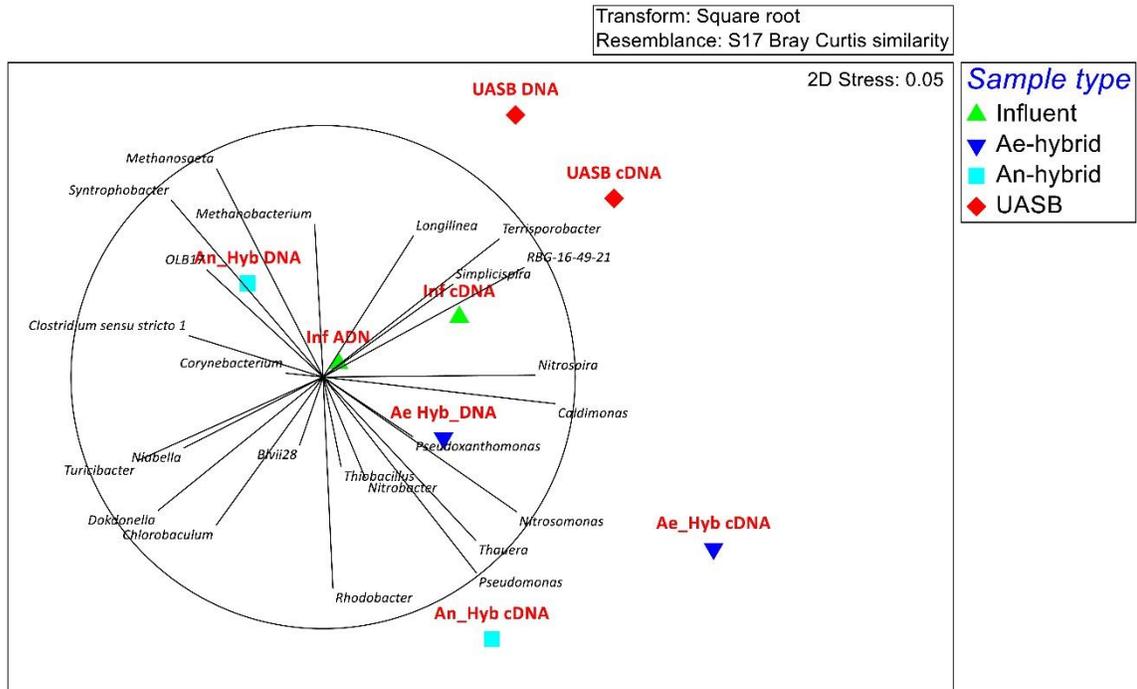


Figura 11. Influencia de los géneros principales en las comunidades microbianas evaluadas. Los vectores indican que tanta influencia tiene ese género microbiano sobre una muestra específica, por tanto, entre más largo sea el vector, mayor influencia tiene el género microbiano que representa sobre esa muestra. La cercanía de las muestras también representa que tan similares son entre sí.

Por otro lado, podemos ver menor distancia entre las muestras de ADN y ADNc en el reactor UASB, indicando que la comunidad total y la comunidad metabólicamente activa son parecidas. Estas comunidades microbianas parecen ser mayormente influenciadas por *Terrisporobacter*, *Longilinea* y *RBG-16-49-21*, tal como en el caso de las muestras del influente ADNc. El rol de *Longilinea* y *RBG-16-49-21* no ha sido reportado en la literatura.

Respecto a la comunidad aerobia, se puede observar a *Pseudoxanthomonas* y *Nitrosomonas* tener un mayor peso sobre la comunidad ADN, los cuales son microorganismos desnitrificantes y desnitrificantes respectivamente. A partir de esto se puede inferir que los organismos que llevan a cabo procesos de remoción de nitrógeno tienen un papel importante en las muestras de las comunidades metabólicamente activas del sistema híbrido, tanto de la sección aerobia como de la sección anaerobia.

VI. CONCLUSIONES

La mayoría de las poblaciones encontradas en las muestras tanto del reactor UASB como del sistema híbrido pertenecen a los filos Firmicutes y Proteobacteria. Las estructuras de las comunidades microbianas estudiadas en este trabajo resultaron estadísticamente diferentes una de la otra. Las diferencias en las comunidades microbianas evaluadas se atribuyen principalmente a los distintos inóculos y ambientes en el que los microorganismos se desarrollaron. La presencia de bacterias nitrificantes en el biorreactor híbrido indica que los procesos de remoción de nitrógeno pueden llevarse a cabo de forma más eficiente en comparación al sistema UASB. Los análisis realizados para correlacionar los parámetros fisicoquímicos con la diversidad de las comunidades microbianas no arrojaron resultados concluyentes ni pudieron contribuir para explicar la relación entre estos. Las principales rutas metabólicas encontradas en nuestras muestras incluyen biosíntesis de antibióticos y aminoácidos. Finalmente, las diferencias en composición y estructura de las comunidades microbianas deben ser evaluadas a través de la comunidad metabólicamente activa vs la comunidad total del sistema.

VII. LITERATURA CITADA

- Adekunle, K. F., y Okolie, J. A. 2015. A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(03), 205.
- Alexandrino, D. A., Mucha, A. P., Almeida, C. M. R., Gao, W., Jia, Z., y Carvalho, M. F. 2017. Biodegradation of the veterinary antibiotics enrofloxacin and ceftiofur and associated microbial community dynamics. *Science of The Total Environment*, 581, 359-368.
- Ali, M., Elreedy, A., Ibrahim, M. G., Fujii, M., y Tawfik, A. 2019. Hydrogen and methane bio-production and microbial community dynamics in a multi-phase anaerobic reactor treating saline industrial wastewater. *Energy Conversion and Management*, 186, 1-14.
- Amin, F. R., Khalid, H., El-Mashad, H. M., Chen, C., Liu, G., y Zhang, R. 2021. Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. *Science of The Total Environment*, 763, 143007.
- Anderson, G., & Yang, G. 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64(1), 53-59.
- Andrade Ochoa, S., Erosa de la Vega, G., y Nevárez Moorillón, G. V. (2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33(3), 233-245.
- APHA/AWWA/WEF, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (APHA-AWWA-WEF). 2001. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edn 5 (2001), pp.185–186 Washington, DC.
- Argudo, M., Gich, F., Bonet, B., Espinosa, C., Gutiérrez, M., y Guasch, H. 2020. Responses of resident (DNA) and active (RNA) microbial communities in fluvial biofilms under different polluted scenarios. *Chemosphere*, 242, 125108.
- Arnáiz, C., Isac, L., y Lebrato, J. 2000. Tratamiento biológico de aguas residuales. *Revista Tecnología del Agua*.
- Arp, D. J. (2009). *Nitrification*. eLS.
- Bang-Andreasen, T., Anwar, M. Z., Lanzen, A., Kjøller, R., Rønn, R., Ekelund, F., y Jacobsen, C. S. 2020. Total RNA sequencing reveals multilevel microbial community changes and functional responses to wood ash application in agricultural and forest soil. *FEMS microbiology ecology*, 96(3), fiae016.
- Bi, S., Hong, X., Yang, H., Yu, X., Fang, S., Bai, Y., y Wang, Y. 2020. Effect of hydraulic retention time on anaerobic co-digestion of cattle manure and food waste. *Renewable Energy*, 150, 213-220.
- Birrer, S. C., Dafforn, K. A., Simpson, S. L., Kelaher, B. P., Potts, J., Scanes, P., y Johnston, E. L. 2018. Interactive effects of multiple stressors revealed by sequencing total (DNA) and active (RNA)

- components of experimental sediment microbial communities. *Science of the Total Environment*, 637, 1383-1394.
- Borrel, G., Adam, P. S., McKay, L. J., Chen, L. X., Sierra-García, I. N., Sieber, C. M., y Gribaldo, S. (2019). Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nature microbiology*, 4(4), 603-613.
- Brasca, M., Morandi, S., y Silveti, T. 2022. *Clostridium* spp. ☆. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third Edition) (pp. 431-438). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22989-2>
- Bucci, P., Coppotelli, B., Morelli, I., Zaritzky, N., y Caravelli, A. 2020. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of wastewater in granular reactor: microbial composition by next generation sequencing analysis. *Journal of Water Process Engineering*, 36, 101254.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Capson-Tojo, G., Moscoviz, R., Astals, S., Robles, Á., y Steyer, J.-P. 2020. Unraveling the literature chaos around free ammonia inhibition in anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109487.
- Cervantes, F. J. 2007. Estrategias para el aprovechamiento de desechos porcinos en la agricultura. *Revista latinoamericana de recursos naturales*, 3(1), 3-12.
- Chan, Y. J., Chong, M. F., Law, C. L., y Hassell, D. G. 2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 1-18.
- Chen, G., Huang, J., Tian, X., Chu, Q., Zhao, Y., y Zhao, H. 2018. Effects of influent loads on performance and microbial community dynamics of aerobic granular sludge treating piggery wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(5), 1443-1452.
- Chen, Y., Lan, S., Wang, L., Dong, S., Zhou, H., Tan, Z., y Li, X. 2017. A review: driving factors and regulation strategies of microbial community structure and dynamics in wastewater treatment systems. *Chemosphere*, 174, 173-182.
- Cheng, H.-H., Narindri, B., Chu, H., y Whang, L.-M. 2020. Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. *Bioresource technology*, 303, 122861.
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., y Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-81.
- Da Silva, M. L. B., Cantão, M. E., Mezzari, M. P., Ma, J., y Nossa, C. W. 2015. Assessment of bacterial and archaeal community structure in swine wastewater treatment processes. *Microbial Ecology*, 70(1), 77-87.

- Daud, M. K., Rizvi, H., Akram, M. F., Ali, S., Rizwan, M., Nafees, M., y Jin, Z. S. 2018. Review of upflow anaerobic sludge blanket reactor technology: Effect of different parameters and developments for domestic wastewater treatment. *Journal of Chemistry*.
- de Oliveira, M. G., Mourão, J. M. M., Silva, F. S. S., Dos Santos, A. B., y Pereira, E. L. 2021. Effect of microaerophilic treatment on swine wastewater (SWW) treatment: Engineering and microbiological aspects. *Journal of Environmental Management*, 299, 113598.
- De Vrieze, J., Pinto, A. J., Sloan, W. T., y Ijaz, U. Z. 2018a. The active microbial community more accurately reflects the anaerobic digestion process: 16S rRNA (gene) sequencing as a predictive tool. *Microbiome*, 6(1), 1-13.
- De Vrieze, J., Regueiro, L., Props, R., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., Carballa, M. 2016. Presence does not imply activity: DNA and RNA patterns differ in response to salt perturbation in anaerobic digestion. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 1-13.
- Díaz-Báez, M. C., Espitia Vargas, S. E., y Molina Pérez, F. (2002). *Digestión Anaerobia: Una aproximación a la tecnología*. Universidad Nacional de Colombia.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., y Langille, M. G. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688.
- González-Tineo, P. A., Durán-Hinojosa, U., Delgadillo-Mirquez, L. R., Meza-Escalante, E. R., Gortáres-Moroyoqui, P., Ulloa-Mercado, R. G., y Serrano-Palacios, D. (2020). Performance improvement of an integrated anaerobic-aerobic hybrid reactor for the treatment of swine wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 34, 101164.
- Han, G., Shin, S. G., Cho, K., Lee, J., Kim, W., y Hwang, S. 2019. Temporal variation in bacterial and methanogenic communities of three full-scale anaerobic digesters treating swine wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1217-1226.
- Iino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K. I., y Haruta, S. (2013). *Candidatus Methanogramma caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes and environments*, ME12189.
- Ijoma, G. N., Nkuna, R., Mutungwazi, A., Rashama, C., y Matambo, T. S. 2021. Applying PICRUSt and 16S rRNA functional characterisation to predicting co-digestion strategies of various animal manures for biogas production. *Scientific Reports*, 11(1), 19913. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99389-4>
- Jung, H., y Pauly, D. 2011. 4.19 - Water in the Pulp and Paper Industry. In P. Wilderer (Ed.), *Treatise on Water Science* (pp. 667-683). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00100-7>
- Kanehisa, M., y Goto, S. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

- Karmakar, R. 2021. State of the art of bacterial chemotaxis. *Journal of Basic Microbiology*, 61(5), 366-379.
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Isaacson, R. 2017. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol*, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, J. H., Chen, M., Kishida, N., y Sudo, R. 2004. Integrated real-time control strategy for nitrogen removal in swine wastewater treatment using sequencing batch reactors. *Water Research*, 38(14-15), 3340-3348.
- Li, W., Khalid, H., Zhu, Z., Zhang, R., Liu, G., Chen, C., y Thorin, E. 2018. Methane production through anaerobic digestion: Participation and digestion characteristics of cellulose, hemicellulose, and lignin. *Applied Energy*, 226, 1219-1228. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.05.055>
- Lim, J. W., Park, T., Tong, Y. W., y Yu, Z. 2020. Chapter One - The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. In Y. Li & S. K. Khanal (Eds.), *Advances in Bioenergy* (Vol. 5, pp. 1-61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2020.04.001>
- Liu, J., Zuo, X., Peng, K., He, R., Yang, L., y Liu, R. 2022. Biogas and Volatile Fatty Acid Production During Anaerobic Digestion of Straw, Cellulose, and Hemicellulose with Analysis of Microbial Communities and Functions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(2), 762-782. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03675-w>
- López-Vázquez, C.M., Buitrón-Méndez, G., García, H.A., Cervantes-Carrillo, F.J. (2008). *Tratamiento Biológico de Aguas Residuales*. IWA Publishing. Reino Unido, Londres.
- Lourinho, G., Rodrigues, L. F. T. G., y Brito, P. S. D. 2020. Recent advances on anaerobic digestion of swine wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(12), 4917-4938. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02793-y>
- Maurice, Corinne F., Haiser, Henry J., Turnbaugh, Peter J. 2013. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. *Cell*, 152(1), 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mehrani, M. J., Lu, X., Kowal, P., Sobotka, D., y Małkinia, J. (2021). Incorporation of the complete ammonia oxidation (comammox) process for modeling nitrification in suspended growth wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Management*, 297, 113223.
- Menzel, T., Neubauer, P., y Junne, S. 2020. Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. *Energies*, 13(21), 5555.
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., y Nghiem, L. D. 2019. Microbial community in anaerobic digestion system: Progression in microbial ecology. In *Water and wastewater treatment technologies* (pp. 331-355). Springer, Singapore.

- Norma Oficial Mexicana. 1996. NOM-001-SEMARNAT-1996
[://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf).
- Noyola, A. Güereca y L.P, Morgan-Sagastume J. 2013. Selección de Tecnologías para el Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: guía de apoyo para ciudades pequeñas y medianas. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ingeniería, México.
- Parades-Aguilar, J., Reyes-Martínez, V., Bustamante, G., Almendáriz-Tapia, F. J., Martínez-Meza, G., Vílchez-Vargas, R., y Calderón, K. 2021. Removal of nickel (II) from wastewater using a zeolite-packed anaerobic bioreactor: Bacterial diversity and community structure shifts. *Journal of Environmental Management*, 279, 111558.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111558>
- Pasalari, H., Gholami, M., Rezaee, A., Esrafil, A., y Farzadkia, M. 2021. Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: A systematic review. *Chemosphere*, 270, 128618.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128618>
- Pishgar, R., Dominic, J. A., Sheng, Z., y Tay, J. H. 2019. Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures. *Bioresource Technology*, 281, 72-83.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.061>
- Reyes, M., Borrás, L., Seco, A., y Ferrer, J. 2015. Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. *Environmental Technology*, 36(1), 45-53. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.934745>
- Rosa, D. M., Sampaio, S. C., Pereira, P. A., Mauli, M. M., y Reis, R. R. D. (2017). Swine wastewater: Impacts on soil, plant, and leachate. *Engenharia Agrícola*, 37, 928-939.
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., y Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 929-936.
- Sanz, J. L., y Köchling, T. 2019. Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(4), 635-680. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09513-0>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2021. www.gob.mx. Marzo del 2021.
<https://www.gob.mx/agricultura/prensa/acuerdan-agricultura-y-opormex-plan-de-fortalecimiento-de-las-cadenas-productivas-en-el-sector-porcicola-nacional>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2021. www.gob.mx. Marzo del 2021.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Resumen Nacional. Gobierno de México. Mayo del 2021. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp
- Shi, L., Liu, N., Liu, G., y Fang, J. 2021. Bacterial Community Structure and Dynamic Changes in Different Functional Areas of a Piggery Wastewater Treatment System. *Microorganisms*, 9(10), 2134.

- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., y Das, S. 2014. 8 - Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In S. Das (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 203-232). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Song, G., Xi, H., Zhou, Y., Fu, L., Xing, X., y Wu, C. 2017. Influence of organic load rate (OLR) on the hydrolytic acidification of 2-butenal manufacture wastewater and analysis of bacterial community structure. *Bioresource Technology*, 243, 502-511. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.162>
- Sorokin, D. Y., Merkel, A. Y., Abbas, B., Makarova, K. S., Rijkstra, W. I. C., Koenen, M., y Van Loosdrecht, M. C. (2018). *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and 'Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum', extremely halo (natrono) philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia classis* nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(7), 2199.
- Spieck, E., Wegen, S., y Keuter, S. (2021). Relevance of *Candidatus Nitrotoga* for nitrite oxidation in technical nitrogen removal systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(19), 7123-7139.
- Stocker, R., y Seymour Justin, R. 2012. Ecology and Physics of Bacterial Chemotaxis in the Ocean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 792-812. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00029-12>
- Venkiteswaran, K., Bocher, B., Maki, J., y Zitomer, D. 2015. Relating anaerobic digestion microbial community and process function: supplementary issue: water microbiology. *Microbiology insights*, 8, MBI-S33593.
- Vivanco, E., Yaya, R. y Chamy, R. (2018). *Manual técnico sobre tecnologías biológicas anaerobias aplicadas al tratamiento de aguas y residuos industriales*. CYTED. España.
- von Sperling, M. (2007). *Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal*. IWA Publishing. Reino Unido, Londres.
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., y Jiang, B. 2018. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. *Bioresource Technology*, 248, 29-36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>
- Wang, Q., y He, J. 2020. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5. *Water Research*, 185, 116300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116300>
- Wang, T.-T., Sun, Z.-Y., Wang, S.-P., Tang, Y.-Q., y Kida, K. 2020. Succession of Total and Active Microbial Community During the Composting of Anaerobic Digested Residue. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4677-4689. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00779-7>
- Yan, Y.-W., Zou, B., Zhu, T., Hozzein, W. N., y Quan, Z.-X. 2017. Modified RNA-seq method for microbial community and diversity analysis using rRNA in different types of environmental samples. *PLOS ONE*, 12(10), e0186161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186161>

- Yin, Z., Bi, X., y Xu, C. 2018. Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater. *Archaea*, 2018.
- Zeng, Z., Zhang, M., Kang, D., Li, Y., Yu, T., Li, W., y Zheng, P. 2019. Enhanced anaerobic treatment of swine wastewater with exogenous granular sludge: Performance and mechanism. *Science of The Total Environment*, 697, 134180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134180>
- Zhao, X., Liu, M., Yang, S., Gong, H., Ma, J., Li, C., y Wang, K. 2022. Performance and microbial community evaluation of full-scale two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge. *Science of The Total Environment*, 814, 152525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152525>
- Zhao, Z., Luo, J., Jin, B., Zhang, J., Li, B., Ma, B. y Shan, B. 2018. Analysis of Bacterial Communities in Partial Nitrification and Conventional Nitrification Systems for Nitrogen Removal. *Scientific Reports*, 8(1), 12930. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30532-4>