

# Caracterización fenotípica y filogenética de un arreglo de reactores UASB en dos etapas

López Vargas Patricia Catalina<sup>1</sup>, Castañeda Briones María Teresa<sup>1</sup>, Meléndez Estrada Jorge<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200. México.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación -ESIA UZ IPN, Miguel Bernard 322, Gustavo A. Madero. Ciudad de México. C.P. 07320. México

\*Autor para correspondencia: katalinalopezv@gmail.com

## Recibido:

15/marzo/2020

## Aceptado:

31/marzo/2020

## Palabras clave:

Biosólidos,  
caracterización  
fenotípica  
filogenética

## Keywords:

Biosolids,  
phenotypic  
phylogenetic  
characterization

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la identificación bacteriana presente en dos reactores anaerobios de flujo ascendente con manto de modos (UASB, del inglés Upflow Anaerobic Sludge Blanket), que se encontraban trabajando en serie (fase acidogénica - fase metanogénica), mediante caracteres fenotípicos y filogenéticos. La caracterización fenotípica reportó la presencia de los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y *Staphylococcus* en el medio acidogénico, y de *Bacillus* y *Syntrophobacter* en el acetogénico; así mismo, se encontró la presencia de *Methanobacetrrium* en los aislados del reactor metanogénico. La caracterización filogenética se realizó con un secuenciador de tercera generación que utiliza tecnología de nanoporos y los resultados reportaron la presencia de los filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Planctomycetes*, *Elusimicrobiales*, *Acidobacterias*, *Thermotogae*, *Synergistetes*, *Firmicutes*, y el taxón OD1 en el reactor acidogénico; y de los filos *Fusobacterias*, *Actinobacterias*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Nanoarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Metazoa* y *Proteobacteria* en el reactor metanogénico.

## ABSTRACT

The objective of this research was the bacterial identification present in two UASB anaerobic reactors that were working in series (acidic phase - methanogenic phase), using phenotypic and phylogenetic characteristics. Phenotypic characterization reported the presence of the genera *Clostridium*, *Bacteroides* and *Staphylococcus* in the acidogenic medium, and *Bacillus* and *Syntrophobacter* in the acetogenic; Also, the presence of *Methanobacetrrium* was found in the isolatedness of the methanogenic reactor. The phylogenetic characterization was performed with a third generation sequencer that uses nanopore technology and the results reported the presence of the phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Planctomycetes*, *Elusimicrobiales*, *Acidobacteria*, *Thermotogae*, *Synergistetes*, *Firmicutes*, and the OD1 taxon in the acidic reactor; and the *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Nanoarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Metazoa* and *Proteobacteria* phyla in the methanogenic reactor.

## Introducción

El comportamiento a nivel microscópico de las comunidades microbianas influye notablemente en el comportamiento macroscópico de los biorreactores. Para identificar bacterias es imprescindible poner de manifiesto rasgos especiales de su metabolismo y fisiología, ya que la simple observación de su forma y tamaño, ofrece una información muy limitada que apenas permite encuadrarlas en grandes grupos (*Salvadó et al., 2005*).

Los elementos básicos de los caracteres taxonómicos son diversos; morfología, fisiología, bioquímica, biología molecular y genética. Con todos ellos se compila una serie de datos que llevan a la caracterización, clasificación y nomenclatura. Dos son los principales esquemas de clasificación, uno basado en las características observables de un organismo dado (fenotípica), y la que tiene en cuenta las relaciones de evolución ancestral de los seres vivos, en este caso las bacterias (filogenética).

Para realizar una caracterización fenotípica es necesario aislar los microorganismos presentes en el lodo de los reactores y obtener cepas puras para posteriormente observar su morfología y realizar pruebas bioquímicas que determinan la actividad metabólica de cada una de esas cepas puras. Sin embargo, cuando se estudian comunidades microbianas mixtas y complejas como los lodos anaerobios, no se pueden separar o aislar por completo todos los microorganismos presentes. La incapacidad del cultivo de una comunidad microbiana para evaluar la gran mayoría de los microorganismos desde su ambiente ha limitado una comprensión exacta de estos organismos (*Hazen et al., 2013*).

Para enfrentar este problema, una amplia gama de enfoques ha descrito a la metagenómica como la herramienta para estudiar comunidades a través del análisis de su material genético sin el cultivo de organismos individuales. La metagenómica es análoga a la genómica con la diferencia de que no se ocupa de un único genoma, de un clon u organismo cultivado o caracterizado en el laboratorio, sino con toda la comunidad microbiana presente en una muestra, evaluando de esta forma el genoma de toda la comunidad. La metagenómica representa un concepto estratégico que incluye investigaciones en tres grandes niveles interconectados (procesamiento de la muestra, la secuenciación del ADN y el análisis funcional), con el objetivo final de

obtener una visión integral del funcionamiento de las comunidades microbianas, que nos permitan responder a las preguntas ¿Quiénes están allí? y ¿Qué están haciendo? (*Hernández et al., 2014*).

Gracias a la generalización de las técnicas de biología molecular, se han ensayado varias técnicas cualitativas y cuantitativas para el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas en relación a los diversos parámetros de operación y control como la eficiencia del tratamiento la producción de biogás y el mejoramiento de las condiciones de operación. Dada su complejidad, estos microbiomas sólo pueden ser inspeccionados adecuadamente utilizando técnicas de secuenciación de alto rendimiento.

En cuanto a la secuenciación del ADN, existen diferentes formas, como la secuenciación de Maxam-Gilbert, el método de Sanger y la pirosecuenciación. La secuenciación de cuarta generación trajo consigo el desarrollo de la tecnología nanopore que busca reemplazar estos métodos al realizar una secuenciación del genoma más rápidamente, más económicamente y potencialmente más viable, pero lo más sobresaliente es la miniaturización del equipo de secuenciación (*Nygaard et al., 2020*). El minION es un dispositivo de secuenciación de bolsillo con tecnología de Oxford Nanopore capaz de secuenciar genomas completos en tiempo real utilizando enzimas unidas al nanoporo que guían el ADN hacia el mismo (*Pérez E., 2018*). El tamaño del nanoporo fuerza a que el ADN que pasa a través de él sea leído base por base. De esta forma, a medida que pasa alguna de las bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina o Timina), la corriente eléctrica varía, permitiendo la lectura de la hebra de ADN.

En este trabajo, se realizó la identificación bacteriana presente en un arreglo de reactores anaerobios de flujo ascendente con manto de lodos (UASB, del inglés Upflow Anaerobic Sludge Blanket) en estudio, mediante caracteres fenotípicos que se observaron de la morfología de las bacterias (tamaño, tipo de reacción a la tinción de Gram), aspecto en los medios de cultivo (morfología, tamaño, coloración, márgenes, elevación, superficie, textura, opacidad), propiedades bioquímicas (metabolismo de nitrógeno, utilización de hidratos de carbono). Así mismo, se realizó la caracterización filogenética mediante taxonomía molecular de metagenómica, basada en la ubicuidad del ARN ribosómico (ARNr); para ello se utilizó un secuenciador de bolsillo minION para secuenciar y caracterizar filogenéticamente el lodo procedente de un arreglo de reactores UASB.

## Metodología

### Caracterización fenotípica

#### Muestreo de lodos

Se tomaron 2 muestras en recipientes estériles con un volumen de 100 mL cada una (una muestra del reactor acidogénico y otra muestra del reactor metanogénico); posteriormente las muestras se burbujearon con NO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en una proporción 80:20 y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C hasta ser procesadas.

#### Preparación de los medios de cultivo

Las poblaciones microbianas fueron aisladas usando los medios de cultivo descritos por Sandoval *et al.*, (2009) para los grupos de bacterias fermentadoras de glucosa y el lactato (BFG) se presentan los reactivos utilizados en la tabla 1. Para las bacterias acetogénicas del propianato, formato y el etanol (BAC) se mencionan los reactivos en la tabla 2. Y finalmente los reactivos usados para las arqueas metanogénicas del acetato, el formato y el metanol (MET) se mencionan en la tabla 3.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para los medios de cultivo de los grupos de bacterias fermentadoras de glucosa y lactato.

Reactivo o sustancia	Cantidad Para 1 L
Solución mineral libre de sulfatos	50 mL
Oligoelementos	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	1 mL (1% w/v)
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mL
Azul de bromotimol	1 mL (1% w/v)
Extracto de levadura	2 g
Caldo de soya	2 g
Selenito de sodio	1.75 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g
Cysteina- HCl	0.25 g
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10 g
Lactato	7.2 mL

**Tabla 2.** Reactivos utilizados para los medios de cultivo de los grupos de bacterias acetogénicas del propianato, formato y etanol.

Reactivo o sustancia	Cantidad Para 1 L
Solución mineral libre de sulfatos	50 mL
Oligoelementos	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	1 mL (1 % w/v)
Selenito de sodio	1 mL
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5 mL
Extracto de levadura	0.1 g L
Caldo de soya tripticaseína	0.1 g
Resazurina	1 mL(1 % w/v)
NaHCO <sub>3</sub>	0.5 g
Cysteine-HCl	0.5 g
Etanol	1 mL
Propianato C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1 g
Formato	1 g

**Tabla 3.** Reactivos utilizados para los medios de cultivo de los grupos de bacterias metanogénicas del acetato, formato y metanol.

Reactivo o sustancia	Cantidad Para 1 L
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	1.2 g
FeCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.36 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.4 g
CaCl <sub>2</sub> 3H <sub>2</sub> O	0.15 g
Extracto de levadura	1 g
Resazurina	1 mL
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g
Ethanol	1 mL
Acetato de sodio	3 g
Lactato	8.5 g

### ***Inoculación e incubación de la biomasa en los medios de cultivo***

Se utilizaron botellas serológicas con capacidad de 100 mL, se inocularon 20 mL de muestra de lodo por 80 mL de medio, posteriormente se gasearon con N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en una proporción 80:20 y se sellaron con tapones de caucho de butilo y agrafes de aluminio, lo cual permitió el uso de agujas hipodérmicas para eliminar el exceso de gas y poder inocular. Se incubaron a 35°C durante 27 días.

### ***Aislamiento de bacterias anaerobias a partir de los medios de cultivo***

A partir de los cultivos que resultaron positivos transcurridos los 27 días de incubación, se inocularon cajas Petri conteniendo agar anaerobio y se incubaron en jarra de anaerobiosis. La prerreducción de los medios sólidos se llevó a cabo utilizando sobres con reactivos generadores de atmósfera de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Transcurridas las 48 horas del periodo de incubación se revisaron las cajas Petri y se señalaron las colonias aisladas. Se prepararon extensiones a partir de las colonias seleccionadas y se tiñeron con la técnica Gram. Se obtuvieron cultivos puros resembrando en tubos con agar inclinado a partir de cada colonia. Estos tubos se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis.

### ***Metabolismo bacteriano***

Para conocer el metabolismo de carbohidratos de las bacterias, se inocularon asépticamente tubos de fermentación con campana Durham, conteniendo carbohidratos en caldo rojo de fenol como indicador. Para conocer la capacidad enzimática de las bacterias, se realizaron las pruebas de hidrólisis del almidón y de la gelatina, la actividad de la nitrato reductasa y de la ureasa. Así mismo, se realizaron las pruebas de movilidad, formación de sulfuros y producción de indol (SIM), las pruebas para diferenciar bacterias entéricas Gram negativas (SIMMONS), la prueba de triple azúcar hierro (TSI); y las pruebas para observar la reacción del rojo de metilo y la de Voges Proskauer (producción de acetil- metil- carbinol), denominadas MR-VP respectivamente.

### ***Cuantificación de los grupos funcionales de anaerobios***

El recuento de los grupos funcionales fue realizado por la técnica de tubos múltiples (APHA *et al.*, 1998), estimándose el número más probable de microorganismos por cada 100 g de muestra (NMP/100 g). Para la cuantificación se realizaron diluciones seriadas desde 10<sup>-4</sup> hasta 10<sup>-6</sup>. Estas diluciones fueron

inoculadas en los medios selectivos estériles, cuyos tubos de cultivo se sellaron con tapones de caucho de butilo y agrafes de aluminio, lo cual permitió el uso de jeringas para agregar las muestras. Se incubaron a 35 °C durante 27 días.

### ***Caracterización filogenética***

#### ***Muestreo y extracción de DNA***

Se tomaron 2 mL de cada una de las muestras de 100 mL con que se hizo la caracterización fenotípica. Se pesaron 0.25 g y se colocaron en dos tubos de microcentrífuga Eppendorf con capacidad de 2 mL. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit comercial DNeasy® Power Soil® Kit que es especial para sedimentos, composta, o lodos; este kit tiene la característica de eliminar los ácidos húmicos y obtener así un DNA de alta pureza para su posterior análisis.

#### ***Cuantificación por espectrometría y fluorimetría***

Una vez extraído el ADN se cuantificó por espectrometría y fluorimetría y se almacenó en congelación a - 20° C. La verificación de ácidos nucleicos se realizó con un espectrofotómetro ultravioleta visible Nanodrop™ 2000 para medida rápida de la pureza de DNA, RNA y proteínas con micromuestra. Para la visualización del ADN se realizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa. El gel se depositó en el generador de imágenes MiniLumi DNR Bio-Imaging-Systems y para leer los resultados se utilizó el programa Gel Capture.

#### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

La PCR se llevó a cabo en un termociclador SimpliAmp Thermal Cycler Thermo Fisher Scientific. Se agregaron 2.5 µL del ADN bacteriano y 22.5 µL de PCR Mix, 0.4 µM de primers para 16S 27F y 1492 R (MWG Eurofins, GmbH) y se preparó un blanco con 2.5 µL de agua libre de nucleasas en lugar de ADN y 22.5 µL de PCR Mix.

#### ***Secuenciación***

La muestra del reactor metanogénico se mandó a secuenciar por Illumina. La muestra del reactor acidogénico se secuenció con el dispositivo minION. Para ello se preparó la muestra con un kit de ligación (Ligation Sequencing kit 1D (SQK-LSK108)) el cual consta de cinco pasos principales, la reparación de extremos, una purificación con perlas y etanol, la ligación de adaptadores, seguida de una segunda purificación con perlas magnéticas y finalmente la carga de la librería en el secuenciador minION. La secuenciación con minION se realizó según las directrices del fabricante utilizando celdas de flujo R9/R9.4 (FLO-MIN105/FLOMIN106, ONT). La secuenciación de minION se controló utilizando

el software Oxford Nanopore Technologies MinKNOW. Las versiones específicas del software utilizado se determinaron mediante la inspección de archivos fast5 del conjunto de datos que usan un formato HDF5. Las llamadas de base se realizaron con el programa postsecuenciación GUPPY (disponible de la comunidad de usuarios de Oxford Nanopore Technologies). La identificación de bacterias y arqueas a nivel género se realizó con la plataforma de análisis de datos basada en la nube EPI2ME. Las secuencias se procesaron previamente, se filtró la calidad y se analizaron mediante QIIME2 (versión 2018.2) para la corrección de secuencia y la eliminación de quimeras. Finalmente, los gráficos se realizaron utilizando el programa krona.

## Resultados y discusión

### Pruebas de pretratamientos térmicos

#### Caracterización fenotípica

La matriz de datos final incorporó información de 47 cepas y 24 parámetros. Se definieron siete grupos con características similares. Las cepas bacterianas aisladas provenientes del caldo de cultivo acidogénico para BFG representan a las clases *Clostridia* y *Bacilli*. Las bacterias del grupo I incluyeron 8 cepas de bacilos grampositivos las cuales no reducen sulfatos y presentaron patrones bioquímicos idénticos a los de la familia *Clostridiaceae*, específicamente al género *Clostridium*. Las bacterias del grupo II incluyeron 5 cepas de bacilos gramnegativos que presentaron rasgos característicos a un *bacterioide*. Las bacterias del grupo III incluyeron 7 cepas de bacilos grampositivos cuyas características coinciden con las de géneros diferentes de *Bacillus*. Las bacterias del grupo IV incluyeron 6 cepas de cocos grampositivos con características similares a las de *Staphylococcus*. Dentro de las bacterias anaerobias, que participan en las fases de hidrólisis y acidogénesis, se encuentran *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Corrales *et al.*, 2015), siendo *Clostridium* el microorganismo que se encuentra principalmente realizando la actividad proteolítica, aunque *Lactobacillus* y *Bacillus*, también lo hacen y en menor medida *Bifidobacterium* y *Staphylococcus* (Rodríguez, 2014).

Las cepas que se aislaron del medio de cultivo acetogénico para BAC también tienen características de la familia *Clostridiaceae*. Las bacterias del grupo V incluyeron 11 cepas de bacilos grampositivos, catalasa negativos identificados como *Clostridium*. Por otro lado, se encontraron 6 cepas de bacterias en el grupo VI, las cuales fueron bacilos gramnegativos que presentan características de *Syntrophobacter*. Las bacterias acetogénicas solo se desarrollan como productoras de H<sub>2</sub>

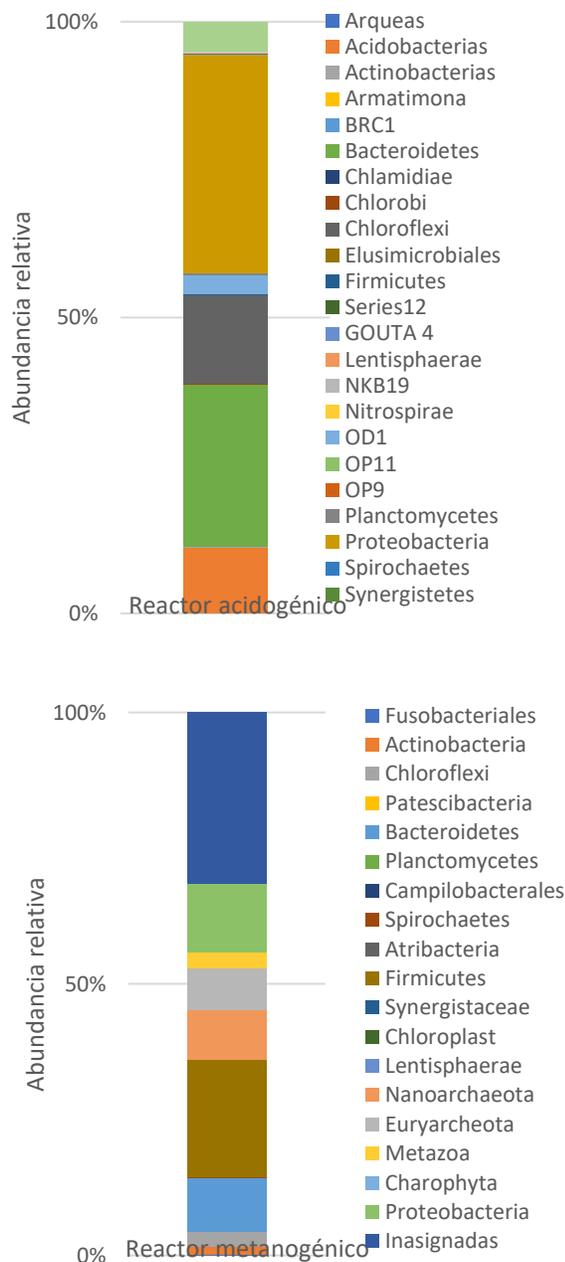
junto a otras bacterias consumidoras de este, la *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolinii*, oxidan ácidos grasos de 4 a 8 átomos de carbono, convierten el propiónico, butírico y algunos alcoholes en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, el cual se utiliza en la metanogénesis (Corrales *et al.*, 2015). Dentro de los géneros más sobresalientes de las bacterias homoacetogénicas, se encuentran *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicuaeticum* y *Acetobacterium woodii* (Díaz *et al.*, 2002).

Las cepas del grupo VII, pertenecen a los medios de cultivo de metanogénicas (MET). Las 4 cepas aisladas presentaron características similares, con colonias de 5 mm, redondas, pegajosas, bordes enteros y extendidos, al realizar la tinción Gram resultaron ser Gram negativas, observándose algunas agrupaciones de bacilos largos. Existen aproximadamente unas 90 especies de metanógenas, distribuidas en cinco clases distintas; *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobiota*, *Methanopyri* y *Methanosarcinales* (Karakashev *et al.*, 2005). Tanto *Methanococci* como *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiota* son cocos esféricos, por lo tanto y debido a que se obtuvieron bacilos largos, puede tratarse de alguna especie de *Methanobacteria*, ya que *Methanopyri* es una arquea hipertermófila, y solo crece a temperaturas de 84 - 110°C.

Las densidades de los diferentes grupos funcionales estudiados en los reactores UASB acidogénico y metanogénico fueron diferentes. El orden de abundancia fue mayor para las BFG en el reactor acidogénico con valores de 1.1X10<sup>8</sup> y de 7.5X10<sup>6</sup> NMP/100 g de lodo en el metanogénico. La abundancia de BAC fue de 9.3X10<sup>6</sup> y 1.5X10<sup>7</sup> NMP/100 g de lodo para las muestras de los reactores acidogénico y metanogénico respectivamente. La cantidad de MET en el reactor metanogénico fue superior a la encontrada en el reactor acidogénico 4.8X10<sup>7</sup> y 3X10<sup>5</sup> NMP/100 g de lodo respectivamente. Los resultados exhiben diferencias entre la diversidad microbiana de ambos reactores, con una proporción de BFG>BAC>MET para el reactor acidogénico y de BAC>MET>BFG para el reactor metanogénico. Las BAC oxidan los productos de la fermentación a acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, pero son inhibidas a ciertas presiones parciales de H<sub>2</sub>, (Cajacuri *et al.*, 2013) de manera que su proliferación depende de la eliminación de este gas por parte de otros grupos microbianos; de acuerdo con lo anterior, se pueden observar densidades mayores de BAC en el reactor metanogénico debido a la relación sintrófica entre MET y BAC, ya que la presencia de las BAC asegura la materia prima para las MET, degradándose eficientemente la materia orgánica para producir CH<sub>4</sub> y, por tanto disminuyendo la Demanda química de oxígeno (DQO) de salida.

### Caracterización filogenética

En la figura 1 se muestran los resultados de la secuenciación de 16s rRNA obtenida en las muestras de los reactores acidogénico y metanogénico.



**Figura 1.** Composición de la comunidad bacteriana. A) abundancia relativa de los diferentes filos (%) en la muestra de lodo del reactor acidogénico. B) ) abundancia relativa de los diferentes filos (%) del reactor metanogénico.

Las bacterias que participan activamente en la etapa de hidrólisis en reactores anaerobios pertenecen principalmente a los filos Chloroflexi, Firmicutes,

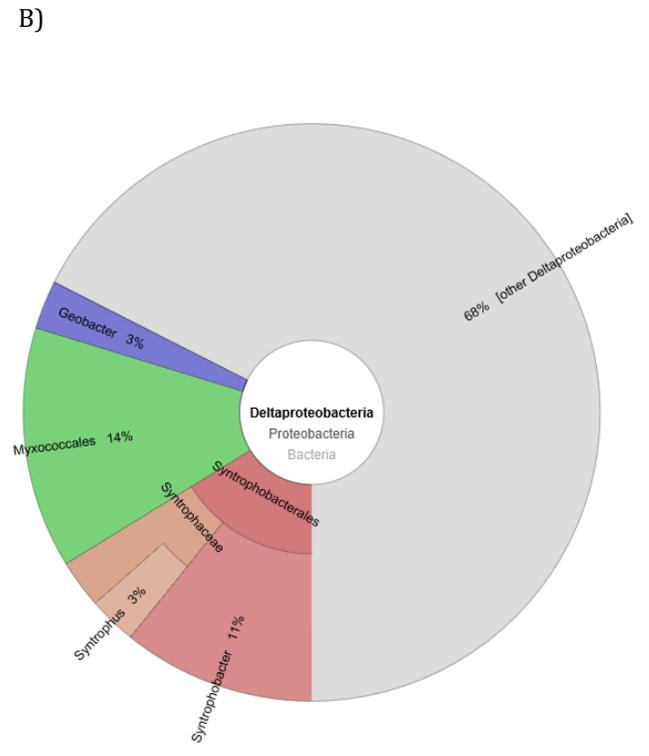
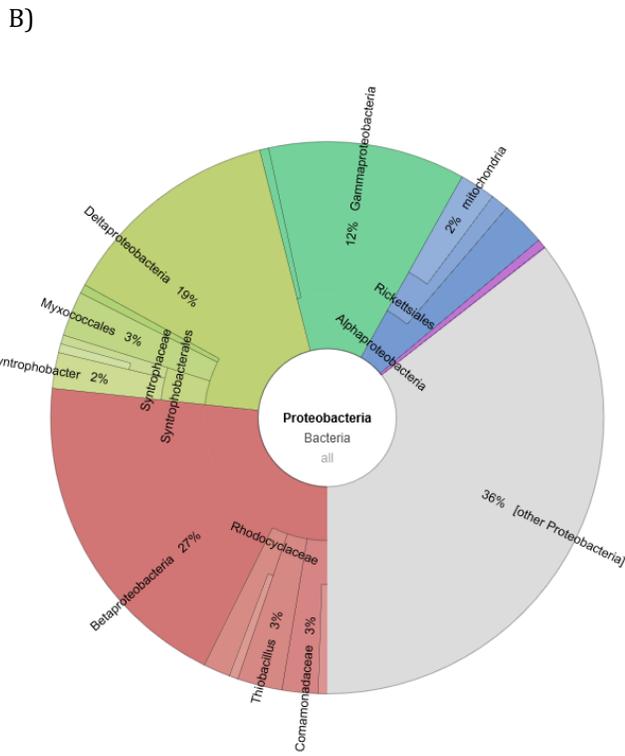
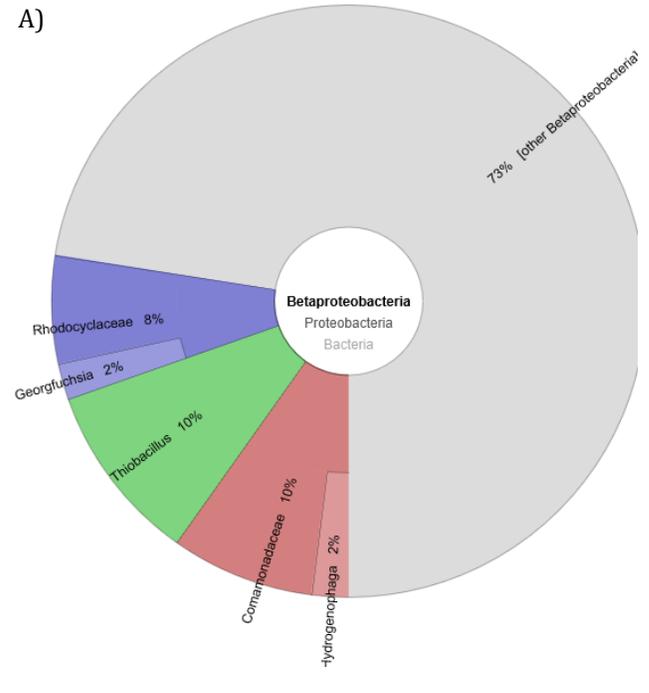
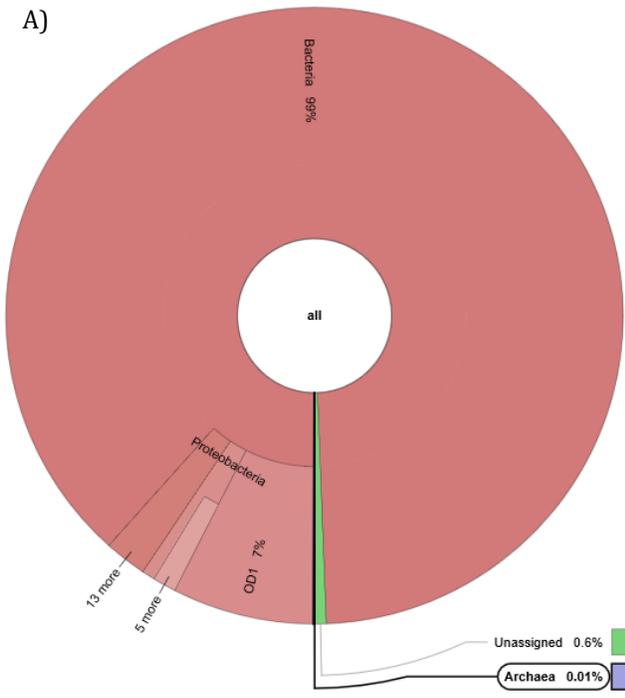
Bacteroidetes y Synergistetes; posteriormente, bacterias pertenecientes a los filos Planctomycetes, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Synergistetes se encargan de la degradación en la acidogénesis (Etchebehere C., 2019). Por su parte, de los filos Proteobacteria y Firmicutes son las principales bacterias productoras de acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> en la acetogénesis (Callejas et al., 2019).

Este estudio es consistente con lo reportado en literatura, ya que la caracterización filogenética reportó la presencia de los filos Proteobacteria (37%), Bacteroidetes (27%), Chloroflexi (15%), Acidobacteria (11%), el taxón OD1 (7%), Actinobacteria (0.2%), Firmicutes y Synergistetes (0.1%) entre otros en el reactor acidogénico. Mientras que en el reactor metanogénico se encontró la presencia de Firmicutes (22%), Proteobacteria (12%), Bacteroidetes (10%), Nanoarchaeaeota (9%), Euryarchaeota (7%), Chloroflexi (3%) y Metazoa (2%).

En la figura 2, se muestran los resultados gráficos obtenidos del programa qiime2 en Krona. Los resultados de la secuenciación muestran un 99% de bacterias, un 0.01% de arqueas y 0.99% de organismos no identificados. De las bacterias, la mayor parte están constituidas por proteobacterias, de estas, el 36% no fue identificado, el 27% corresponde a betaproteobacterias, el 19% a deltaproteobacterias, el 12% a gammaproteobacterias, 4% a alphaproteobacterias y el 2% restante a epsilonproteobacterias.

Dentro de las proteobacterias que son bacterias Gram negativas con una pared celular formada principalmente de lipopolisacáridos, se encontraron betaproteobacterias, dentro de este grupo se observan las familias de organismos Rodocyclaceae, Thiobacillus y Comamonadaceae que utilizan como nutrientes los compuestos obtenidos de la descomposición anaerobia de materia orgánica como hidrógeno, metano y amoníaco, son anaerobias facultativas y muchas veces se encuentran en muestras ambientales de agua o suelo. También se encontraron las deltaproteobacterias que son predadores de otras bacterias y contribuyen en el ciclo del azufre el género Syntrophus como Syntrophaceae y Syntrophobacterales.

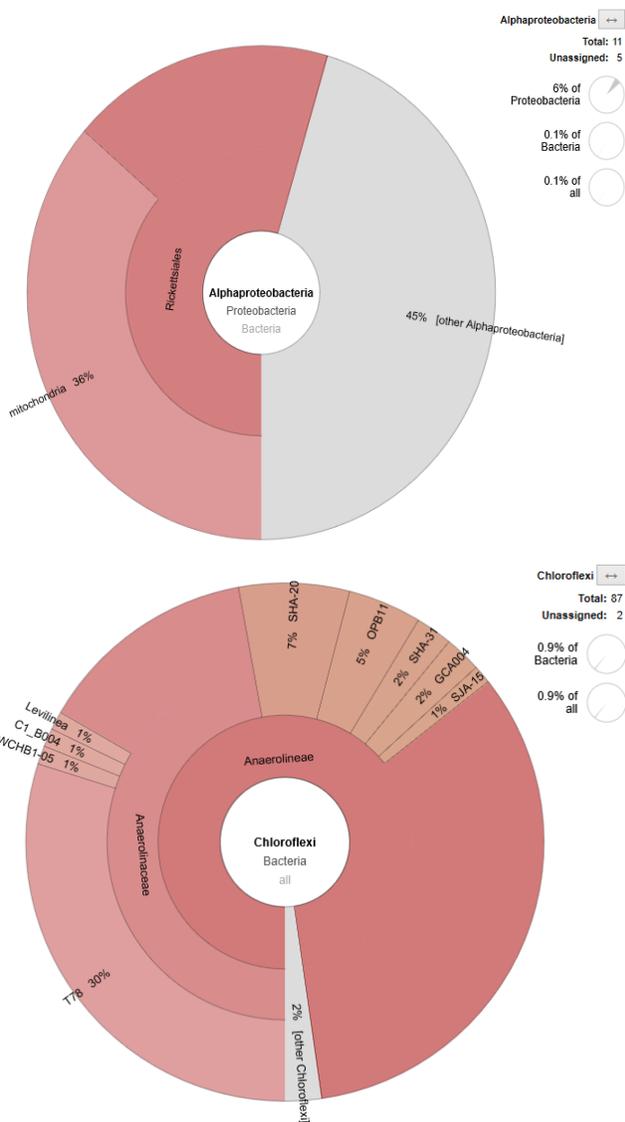
Se reportó también la presencia del taxón OD1, que es un filo candidato de un extenso grupo de bacterias recientemente propuesto sobre la base de análisis genómicos llamado también Parcubacteria (Harris, 2004). Estas bacterias se caracterizan por células extremadamente pequeñas, genomas reducidos y capacidades metabólicas limitadas, centradas principalmente en la fermentación, que generalmente viven como simbioses en comunidades microbianas. En la figura 3, se muestran los gráficos de las proteobacterias beta y delta.



**Figura 2.** Porcentajes de microorganismos presentes en la muestra de lodo residual. **A)** Porcentaje del todo. **B)** Porcentaje correspondiente a las proteobacterias.

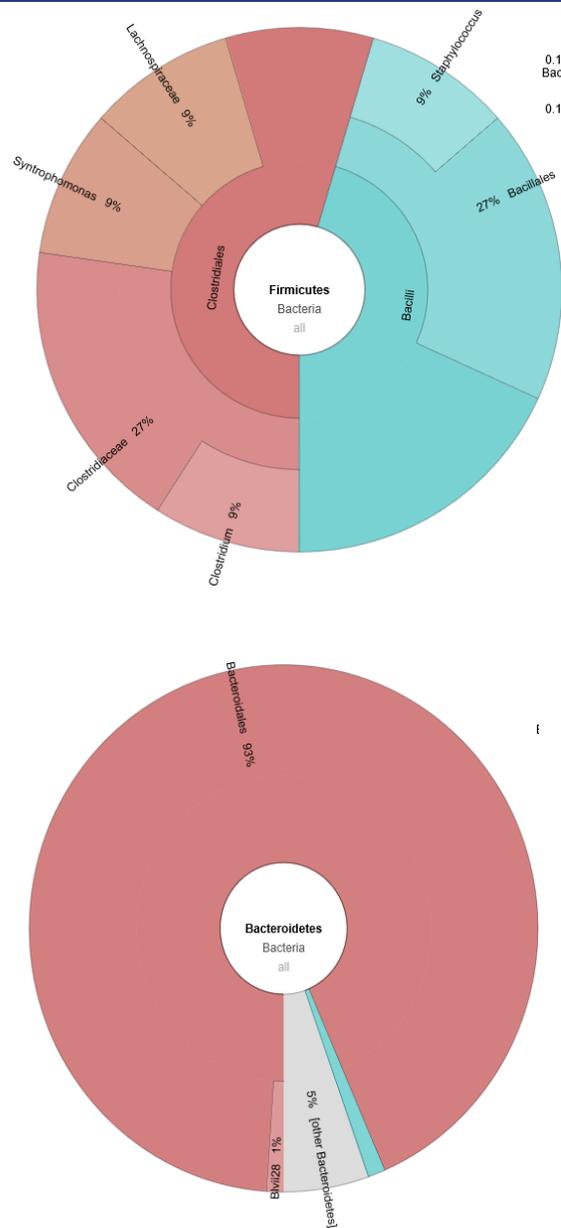
**Figura 3.** Porcentajes de proteobacterias presentes en la muestra de lodo residual. **A)** Betaproteobacterias, **B)** Deltaproteobacterias.

En la figura 4 se aprecia la distribución de las alphaproteobacterias como *Rickettsiales* en este caso *Mitochondria* que crecen con concentraciones muy bajas de nutrientes. También se muestra el segundo filo que se encontró en la muestra que fue el de *Chloroflexi*.



**Figura 4.** Porcentajes de la clase alphaproteobacterias y Filo Chloroflexi presentes en la muestra.

En la figura 5 se pueden observar los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Dentro de los firmicutes se localizaron clases de *Clostridia* y *Bacilli*, con los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Syntrophomonas*. Por su parte los bacteroides se encontraron en un porcentaje del 0.9 del total de las bacterias con la presencia de bacteroidales como el Blvii28.



**Figura 5.** Presencia de los phylum Firmicutes y Bacteroidetes

En la figura 6 se pueden observar los filos *Spirochaetes* y *Planctomycetes*. De los primeros, también llamados espiroquetas debido a que tienen células enrolladas en forma de sacacorchos o espirales, los cuales permiten que se mueva, se encontraron los géneros *Treponema* y *Leptonema*. Sobre los *Planctomycetes*, se puede mencionar que tienen una alta capacidad de síntesis de esteroides, un tipo de lípidos sintetizados a partir de acetil-coenzima A, a través de la vía HMG-CoA reductasa; el 50 de los planctomycetes corresponde a la familia *Pirellulaceae* que se encuentra comúnmente en muestras de suelo.



**Figura 6.** Presencia de los phylum Spirochaetes y Planctomycetes

## Conclusiones

El uso de la microscopía tradicional aportó información cualitativa de una importante diversidad de componentes de la comunidad microbiana. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la estructura y dinámica de las comunidades de microorganismos que habitan los lodos anaerobios, mediante la adopción de una estrategia mixta, que integró técnicas de microscopía y de biología molecular.

La caracterización fenotípica reportó la presencia de los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y *Staphylococcus* en el medio acidogénico, y de *Bacillus* y *Syntrophobacter* en el acetogénico. No se encontraron bacterias sulfatorreductoras en los aislados al realizar las pruebas bioquímicas. Se encontró la presencia de *Methanobacterium* en los aislados del reactor metanogénico.

La caracterización filogenética reportó la presencia de los filos *Firmicutes* (22%), *Proteobacteria* (12%), *Bacteroidetes* (10%), *Nanoarchaeaeota* (9%), *Euryarchaeota* (7%), *Chloroflexi* (3%) y *Metazoa* (2%) dentro del reactor metanogénico. Mientras que en el reactor acidogénico se encontró la presencia de *Proteobacteria* (37%), *Bacteroidetes* (27%), *Chloroflexi* (15%), *Acidobacteria* (11%), el taxón OD1 (3%), *Actinobacteria* (0.2%), *Firmicutes* y *Synergistetes* (0.1%).

Los resultados presentados en este estudio aportan evidencias sobre la dinámica poblacional de reactores anaerobios UASB, durante el tratamiento de lodos residuales. El presente estudio, proporciona los resultados de un análisis preliminar de las comunidades microbianas en reactores anaerobios basado en la secuenciación de amplicón del gen 16S rRNA, utilizando la tecnología de Illumina y el MinION de Oxford Nanopore Technologies (ONT). Con base a los resultados microbiológicos se buscarán correlaciones con los parámetros de operación que puedan facilitar la comprensión del comportamiento del proceso.

## Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por CONACYT. Patricia Catalina López Vargas agradece a CONACYT por la beca otorgada con número de becario y CVU 637812.

Al laboratorio OpenLab y Solaria Biodata por facilitarnos el uso de sus instalaciones para realizar la secuenciación por minION.

Al departamento de Hidrobiología y al laboratorio de biología molecular de UAM Iztapalapa por permitirnos trabajar en sus instalaciones.

## Referencias

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environmental Federation (WEF) (1998.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington DC.



- Cajacuri M., Rincón N., Araujo I., Behling E., Gilberto C., Marín J. (2013). Diversidad Microbiológica del lodo anaerobio durante el tratamiento de aguas de producción petroleras venezolanas. *Ing. Invest y tecnol.* 14, no,3 México.
- Callejas C., Fernández A., Passegui M., Wenzel J., Bovio P., Borzzacconi L., Etchebehere C. (2019). Microbiota adaptation after alkaline pH perturbation in a full-scale UASB anaerobic reactor treating dairy wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42: 2035–2046.
- Corrales L., Antolinez D., Bohórquez J., Corredor A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13: 55-81.
- Díaz M., Espitia S., Molina F. (2002). Digestión Anaerobia, una aproximación a la tecnología. UNIBIBLIOS. Bogotá Colombia.
- Etchebehere C. (2019). Microbioma de reactores metanogénicos escala real abriendo la caja negra, 5to curso RED TRITÓN, Ballaterra, Barcelona. Recuperado el 23 de septiembre de 2020, de <http://triton-cyted.com/wp-content/uploads/2019/10/Microbioma.pdf>
- Harris J., Kelley S., Pace N. (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP1. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 845-849.
- Hazen T., Rocha A., Techtmann S. (2013). Advances in monitoring environmental microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 526-533.
- Hernández L., Hubber D., Luévanos M., Hernández F., Saenz J., Balagurusamy N. (2014). Metagenómica: Concepto y aplicación en el mundo microbiano. *Researchgate*. Recuperado el 23 de septiembre de 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/340720264\\_Metagenomica\\_Concepto\\_y\\_Aplicaciones\\_en\\_el\\_Mundo\\_Microbiano](https://www.researchgate.net/publication/340720264_Metagenomica_Concepto_y_Aplicaciones_en_el_Mundo_Microbiano)
- Karakashev D., Batstone J., Angelidaki I. (2005). Influence of Environmental Conditions on Methanogenic Compositions in Anaerobic Biogas Reactors. *Applied and environmental microbiology*, 71: 331-338.
- Nygaard A., Tunsjo H., Meisal R., Charnock C. (2020). A preliminary study on the potential of nanopore MinION and Illumina Mseq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *A nature research journal, Scientific Reports 10*, 3209 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59771-0>
- Pérez E. (2018). MinION: ¿El dispositivo que secuenciará el primer genoma alienígena? *ResearchGate. Revista de Biología Tropical*. Recuperado el 23 de septiembre de 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/328027895\\_MinION\\_El\\_dispositivo\\_que\\_secuenciara\\_el\\_primer\\_genoma\\_alienigena](https://www.researchgate.net/publication/328027895_MinION_El_dispositivo_que_secuenciara_el_primer_genoma_alienigena)
- Rodríguez J. (2014). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Apuntes de Ingeniería Sanitaria. Universidad el Valle. Cali Colombia. Disponible en <http://www.ingenieroambiental.com/4014/tratamiento545.pdf>
- Salvadó H., Prenafeta F., Arnabat C., Fernández B., Guivernau M y Canals O. (2005). Aplicación de técnicas microscópicas y moleculares para el análisis de las comunidades microbianas de un digestor anaerobio industrial como herramienta para su digestión. Ponencia presentada en la Entidad de Saneamiento y Depuración de la región de Murcia (esamur). Recuperado el 23 de sep de 2020, de <http://www.esamur.com/public/file/ponencia131.pdf>
- Sandoval C., Vergara M., Arango M., Castillo E. (2009). Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobic sludges used in urban solid waste treatment. *Waste Management 29* 704-711.