



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

Análisis Metataxonómico en la Digestión Anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Biotecnología

PRESENTA:

Biol. Exp. Yovany Cuetero Martínez.

COMITÉ TUTORIAL

Codirector: Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo¹.

Codirector: Dr. Hugo C. Ramírez Saad².

Asesora: Dra. María Eugenia de la Torre Hernández².

¹ Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales.

² Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio de Ecología Molecular.

Por posibilitar el desarrollo de esta tesis, se agradece:

Al programa de Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT bajo el número de referencia 001465 y está consolidado con nivel de competencia internacional.

Al programa de becas de manutención del CONACYT por medio del cual se me otorgó el apoyo económico con número de folio 425746.

Al Cluster de Biocombustibles Gaseosos-CEMIEBio del Fondo de Sustentabilidad Energética del CONACYT-SENER que financia el proyecto de “Digestión Anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos”.

Con respecto a los recortes presupuestales en Ciencia y Tecnología en el periodo en que se realizó este proyecto; se exhorta a las autoridades del CONACYT a exigir mayor presupuesto en este rubro, a continuar otorgando becas de manutención a todos los alumnos aceptados en posgrados pertenecientes al PNPC de todo el país y a no reducir el monto económico de las mismas con el cambio en la unidad de pago, de salario mínimo a Unidad de Medida y Actualización (UMA), ya que sin estas medidas se rezagará la investigación científica que es tan necesaria para lograr el desarrollo sustentable (económico, social y ambiental) de nuestro país y del mundo.

Acta de aprobación de tesis

México, CDMX a 29 de Junio del 2018.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana decidió aprobar la tesis titulada

“Análisis Metataxonómico en la Digestión Anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos”

para ser presentada en un examen para la obtención del grado de Maestro en Biotecnología por el

Biol. Exp. Yovany Cuetero Martínez

Comité tutorial:

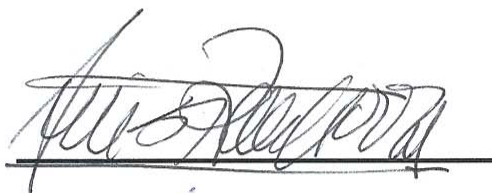
Codirector: Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo.
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. Departamento de Biotecnología.

Codirector: Hugo César Ramírez Saad.
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos.


Asesora: Dra. María Eugenia de la Torre Hernández.
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos.

Miembros del jurado:

Presidente: Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez
Instituto Politécnico Nacional.
Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD)



Secretaria: Dra. Florina Ramirez Vives
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
Departamento de Biotecnología.



Vocal: Dr. José Félix Aguirre Garrido
Universidad Autónoma Metropolitana- Lerma.
Departamento de Ciencias Ambientales.



Vocal: Dra. María Eugenia de la Torre Hernández
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco.
Departamento de Sistemas Biológicos.



Dedicatoria

A Dianyss, mi compañera de sueños.

A mis sobrinos, Dana, Titan, Ali, Ñaño, Ángel, Brenda, Leo y Aby, mientras van por el mundo explorando, sorprendiéndose, preguntando como científicos, como diciéndome que cuando se deja de jugar se deja de aprender, de crecer.

Agradecimientos

A mis familiares

A mis padres, por el amor que siempre me han brindado.

A mis hermanos, por apoyar mis locuras desde niño.

A los Ecólogos Moleculares

Al Dr. Hugo Ramírez, por sus enseñanzas como investigador y como humano.

Al Dr. Félix Aguirre, porque puedo presumir que soy amigo de personas como él, sin sus asesorías esto no hubiera sido posible.

A la Dra. María E. de la Torre, por su amabilidad y hacer que todo funcione en el laboratorio.

Al Mtro. Mario Soto, mi hermano y mentor en Ecología Molecular.

A mis compañeros Gaby, Ale, Samael, Erik, Dan, Leilani, por hacer agradables las sesiones de laboratorio.

A los Biotecnólogos

Al Dr. Oscar Monroy, por el apoyo y los consejos brindados desde la licenciatura.

A los I.B.I. Alejandro Ferreira y Rodrigo Aguilar, por hacer amena la colecta de muestras en la PP9.

A la I.B.I. Adirana Reyes por medir y brindarme los datos correspondientes a los parámetros fisicoquímicos de operación en la PP9.

A mis compañeros Ulises, Rosy, Rubén, Miguel, Pepe, Paco, Cony, Reyna, Elia, Rosalinda, Chayo, Carmen y Florina por las conversaciones y por las observaciones durante los seminarios.

A la generación de maestría 15O, por compartir risas, apuntes, estrés... su amistad.

Índice

Acta de aprobación de tesis	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos.....	V
Índice.....	VI
Índice de ilustraciones.....	X
Índice de tablas	XII
Abreviaturas	XIII
Resumen.....	XV
Abstract	XVII
1. Introducción	1
1.1. Justificación.....	1
1.1.1. Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos	1
1.1.2. Digestión anaerobia de la FORSU.....	2
1.1.3. Comunidades microbianas en la digestión anaerobia	3
1.1.4. Análisis metataxonómico en la digestión anaerobia en dos etapas.....	5
1.2. Objetivos	7
1.2.1. General.....	7
1.2.2. Particulares.....	7
1.3. Revisión bibliográfica	8
1.3.1. Caracterización de comunidades microbianas: contexto histórico.....	8
1.3.2. Adaptación de consorcios microbianos en la DA.....	10

1.3.3.	Factores que afectan la composición y estructura de las comunidades microbianas en la DA.....	11
1.3.4.	Similitudes entre las comunidades microbianas de diferentes sistemas de DA.....	13
1.3.5.	Taxa microbianos no caracterizados previamente en la DA.....	14
1.3.6.	Relación entre la abundancia de un taxón y su actividad metabólica en la DA	14
1.3.7.	Disminución de bacterias coliformes en la DA.....	14
1.3.8.	Proporción entre bacterias y arqueas en la DA	15
1.3.9.	Estudio previo.....	15
1.4.	Hipótesis	20
2.	Material y métodos	21
2.1.	Muestreo	21
2.1.1.	Características del sistema de DA en dos etapas de la FORSU	21
2.1.2.	Muestreo estratificado en el RHALE.....	23
2.1.3.	Colecta de lodo del <i>UASB</i>	25
2.1.4.	Muestreo a través del tiempo.....	25
2.2.	Extracción de <i>DNA</i>	25
2.3.	Análisis de <i>DNA</i>	25
2.4.	Secuenciación masiva del gen <i>16S rRNA</i>	26
2.5.	Análisis bioinformático y bioestadístico.....	27
2.5.1.	Análisis de calidad y selección de secuencias	27
2.5.2.	Clasificación de secuencias.....	27
2.5.3.	Análisis de esfuerzo de secuenciación	28
2.5.4.	Cálculo de estimadores de biodiversidad	29

2.5.5. Elaboración de gráficos de composición y estructura de las comunidades microbianas	29
2.5.6. Análisis multivariable para las diferentes muestras	29
2.5.7. AMOVA.....	30
3. Resultados y análisis	31
3.1. Condiciones de operación del sistema de digestión anaerobia en dos etapas de FORSU	31
3.1.1. Etapa hidrolítica-acidogénica en el RHALE	33
3.1.2. Etapa acetogénica- metanogénica en el UASB.....	35
3.2. Extracción y análisis de <i>DNA</i>	39
3.2.1. Amplificación del <i>DNA</i> de bacterias.....	41
3.2.2. Amplificación del <i>DNA</i> de arqueas	41
3.3. Análisis de la comunidad bacteriana	43
3.3.1. Esfuerzo de secuenciación.....	43
3.3.2. Estimadores de biodiversidad.....	46
3.3.3. Similitudes entre comunidades bacterianas	49
3.3.4. Composición y estructura de las comunidades bacterianas	53
3.3.5. Efecto de la altura y el tiempo sobre la abundancia de las UTO bacterianas más representativas del RHALE	60
3.3.6. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la primera etapa de la DA	62
3.3.7. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la segunda etapa de la DA.....	71
3.4. Análisis de las comunidades de arqueas	88
3.4.1. Esfuerzo de secuenciación.....	88
3.4.2. Estimadores de biodiversidad.....	90

3.4.3.	Similitud entre comunidades de arqueas.....	92
3.4.4.	Composición y estructura de las comunidades de arqueas.....	95
3.4.5.	UTO de arqueas más representativas en el sistema de DA2E.....	100
3.4.6.	Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la primera etapa de la DA.	101
3.4.7.	Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la segunda etapa de la DA.....	103
4.	Conclusiones	109
5.	Recomendaciones	113
6.	Bibliografía.....	114
7.	Anexos.....	122
	Anexo A. Aparato para muestreo estratificado en el RHALE.	122
	Anexo B. Electroforesis en gel de agarosa	124
	Anexo C. Cuantificación del <i>DNA</i> con NanoDrop	125
	Anexo D. Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> de arqueas y bacterias	126
	Anexo E. Análisis bioinformático del gen <i>16S rRNA</i> metagenómico con el software bioinformático Mothur.....	129

Índice de ilustraciones

Figura 1. Composición de los RSU	2
Figura 2. Digestión anaerobia	3
Figura 3. Digestión anaerobia en dos etapas (DA2E) de la FORSU	22
Figura 4. Seccionamiento de la superficie del RHALE	23
Figura 5. Condiciones de operación del sistema de DA2E de la FORSU	32
Figura 6. pH de las entradas y salidas del RHALE.....	33
Figura 7. Masa acumulada de FORSU y digestato	34
Figura 8. DQO acumulada de las entradas y salidas del RHALE.....	35
Figura 9. pH de la entrada y salida del <i>UASB</i>	35
Figura 10. Concentraciones de DQO en la entrada y salida del <i>UASB</i>	36
Figura 11. Concentración de amonio en la entrada y salida del <i>UASB</i>	37
Figura 12. Producción de biogás en la etapa acetogénica-metanogénica	38
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los <i>DNA</i> extraídos	39
Figura 14. Electroforesis para amplicones de las región V6-V8 del gen <i>16S rRNA</i> bacteriano.....	41
Figura 15. Electroforesis para amplicones de la región V4-V6 del gen <i>16S rRNA</i> de arqueas.	42
Figura 16. Curvas de rarefacción para las comunidades bacterianas.....	44
Figura 17. Análisis de componentes principales (<i>PCA</i>) para las comunidades bacterianas.....	51
Figura 18. Composición y estructura de la comunidad bacteriana del RHALE.	56
Figura 19. Composición y estructura de la comunidad bacteriana del <i>UASB</i>	57
Figura 20. UTO bacterianas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica....	61

Figura 21. UTO bacterianas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica	71
Figura 22. Curvas de rarefacción para las comunidades de arqueas.	89
Figura 23. Análisis de componentes principales para las comunidades de arqueas. 94	
Figura 24. Composición y estructura de la comunidad de arqueas del estrato superior del RHALE.....	97
Figura 25. Composición y estructura de la comunidad de arqueas del <i>UASB</i>	98
Figura 26. UTO de arqueas más abundantes en el sistema de DA2E	100

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios de la caracterización de comunidades microbianas en la DA.....	16
Tabla 2. Origen y etiquetas de las muestras de estudio.....	24
Tabla 3. Balance de DQO en el RHALE.....	34
Tabla 4. Balance de DQO para el UASB.....	37
Tabla 5. Concentración y pureza de los DNA.....	40
Tabla 6. Esfuerzo de secuenciación para las comunidades bacterianas.	45
Tabla 7. Estimadores de biodiversidad para las comunidades bacterianas	46
Tabla 8. Correlaciones (arriba) y probabilidad de correlaciones (abajo) entre comunidades bacterianas.....	50
Tabla 9. Efecto de la posición y el tiempo sobre las ARS de las UTO más dominantes en el RHALE.....	60
Tabla 10. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica.....	62
Tabla 11. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica.	72
Tabla 12 Esfuerzo de secuenciación para las comunidades de arqueas.....	89
Tabla 13. Estimadores de biodiversidad para las comunidades de arqueas.....	91
Tabla 14. Correlaciones (arriba) y probabilidad de correlaciones (abajo) entre las comunidades de arqueas.	93
Tabla 15. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica.....	101
Tabla 16. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica.	103

Abreviaturas

16S rRNA: RNA de la subunidad pequeña del ribosoma procariota.

AGV: Ácidos grasos volátiles.

AMOVA: Análisis molecular de varianza.

ARM: Agua residual municipal.

ARS: Abundancia relativa de secuencias.

CH₄: Metano.

CO₂: Dióxido de carbono.

DA: Digestión anaerobia.

DA2E: Digestión anaerobia en dos etapas.

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DQO: Demanda química de oxígeno.

FORSU: Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

H₂: Hidrógeno gaseoso.

H₂S: Sulfuro de hidrógeno.

NC: UTO no clasificada al nivel taxonómico en cuestión.

NGS: Secuenciación de nueva generación.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RHALE: Reactor hidrolítico-acidogénico de lecho escurrido.

RNA: Ácido ribonucleico.

TRH: Tiempo de retención hidráulica.

TRS: Tiempo de retención de sólidos.

UASB: Reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente.

UTO: Unidad taxonómica operacional.

η : Eficiencia

Resumen

El tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) puede realizarse mediante un proceso microbiológico llamado digestión anaerobia en dos etapas (DA2E); la primera es hidrolítica-acidogénica y la segunda acetogénica-metanogénica. Las comunidades microbianas que llevan a cabo la DA2E de la FORSU son metabólicamente y taxonómicamente diversas.

El objetivo de este estudio fue conocer la composición y estructura de las comunidades microbianas en la DA2E de la FORSU.

Se caracterizaron las comunidades microbianas mediante el análisis metataxonómico del gen *16S rRNA* en un sistema de DA2E a escala piloto, 23/12 °C día/noche. La primera etapa fue operada bajo un pH de 5.2 en un reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE); la segunda bajo un pH de 8.1 en un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB). Se tomaron muestras en los días 1, 15 y 30 de estudio.

Las principales conclusiones son:

En la etapa hidrolítica-acidogénica los géneros microbianos dominantes fueron: con respecto a la comunidad bacteriana, *Prevotellaceae* no clasificado (NC) (51%), *Megasphaera* (16%), *Lactobacillus* (10%), *Prevotella* (5%), etc.; y con respecto a la comunidad de arqueas, *Methanobrevibacter* (79%) y *Methanobacteriaceae* NC (20%).

En la etapa acetogénica-metanogénica la comunidad bacteriana estuvo representada por Bacteroidetes NC (22%), *Pseudomonas* (18%), Comamonadaceae NC (6%), *Clostridium sensu stricto* (5%), etc.; mientras que en la comunidad de arqueas géneros más abundantes fueron *Methanosaeta* (67%), y *Methanobacterium* NC (14%),

Las estructuras de las comunidades microbianas del sistema de DA2E fueron estables en el tiempo de estudio.

Se observaron diferencias significativas entre la abundancia relativa de los géneros bacterianos *Megasphaera* y *Acetobacter* a diferentes posiciones (alturas) en el RHALE, por lo que la posición es un factor que afecta las estructuras de las comunidades microbianas en reactores hidrolítico-acidogénicos con un alto contenido de sólidos orgánicos.

Abstract

The treatment of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) can be done through a microbiological process called two stage anaerobic digestion (2SAD); the first is hydrolytic-acidogenic and the second is acetogenic-methanogenic. The microbial communities that carry out the 2SAD of the OFMSW are metabolically and taxonomically diverse.

The objective of this study was to know the composition and structure of the microbial communities in the 2SAD of the OFMSW.

Microbial communities were characterized by metataxonomic analysis of the 16S rRNA gene in a pilot scale 2SAD system, operated to 23/12 °C day/night. The first stage was operated under a pH of 5.2 in a drained bed hydrolytic-acidogenic reactor (DBHAR); the second under a pH of 8.1 in an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB). Samples were taken on days 1, 15 and 30 of the study.

The main conclusions are:

In the hydrolytic-acidogenic stage, the dominant microbial genera were: with respect to the bacterial community, unclassified (UC) Prevotellaceae (51%), *Megasphaera* (16%), *Lactobacillus* (10%), *Prevotella* (5%), etc.; and with respect to the archaea community, *Methanobrevibacter* (79%) and UC Methanobacteriaceae (20%).

In the acetogenic-methanogenic stage the bacterial community was represented by UC Bacteroidetes (22%), *Pseudomonas* (18%), UC Comamonadaceae (6%), *Clostridium sensu stricto* (5%), etc.; whereas in the community of archaea more abundant genera were *Methanosaeta* (67%), and UC Methanobacterium (14%).

The structures of the microbial communities of the 2SAD system were stable at the time of study.

Significant differences were observed between the relative abundance of the bacterial genera *Megasphaera* and *Acetobacter* at different positions (heights) in the DBHAR, so the position is a factor that affects the structures of the microbial communities in hydrolytic-acidogenic reactors with a high content of organic solids.

1. Introducción

Una pregunta que el ser humano se hace frecuentemente es si hay vida en otros planetas. Sin duda un descubrimiento así sería revolucionario. Imaginemos lo que sintieron los que vieron bajo sus microscopios, por primera vez, seres diminutos que habían pasado inadvertidos; se abrió un mundo nuevo, el de los microbios.

Georges Dreyfus

1.1. Justificación

1.1.1. Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

A medida que la urbanización incrementa, la generación de residuos sólidos urbanos también, generando problemas sociales, económicos y ambientales, haciendo necesaria una gestión sustentable de dichos residuos (Hoornweg and Bhada-Tata 2012).

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), que a nivel mundial comprende el 46% y en México el 52% de los RSU que se recolectan (Figura 1); está compuesta por residuos biodegradables, es decir, que pueden ser fácilmente degradados por organismos vivos y son principalmente restos de comida, hojas, hierba, maleza y madera (Hoornweg and Bhada-Tata 2012; INEGI 2014).

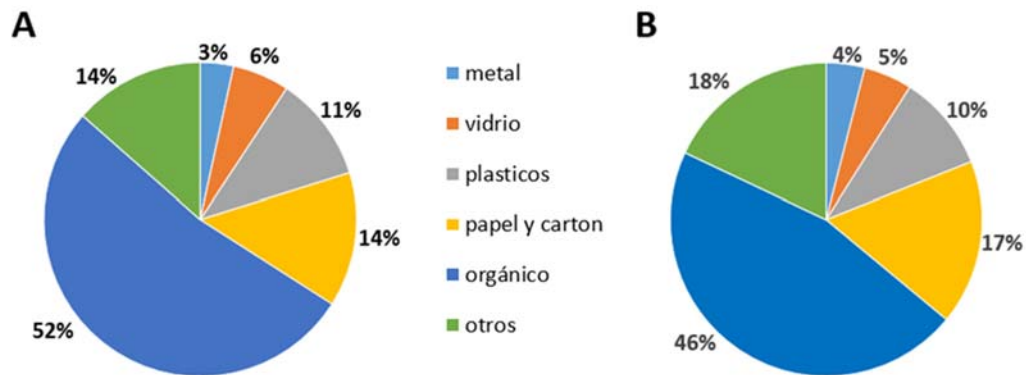


Figura 1. Composición de los RSU
A) En México B) En el mundo.

1.1.2. Digestión anaerobia de la FORSU

Debido a la biodegradabilidad de la FORSU es posible su tratamiento mediante digestión anaerobia (DA), que es considerada un tipo de tecnología ambiental viable para la producción de biogás, considerado un tipo de energía renovable útil para generar energías eléctrica y térmica. La DA es un proceso microbiológico en el que las macromoléculas orgánicas (polisacáridos, proteínas y lípidos) son transformadas en biogás (Vanwonterghem *et al.* 2015; Li *et al.* 2011, Khalid *et al.* 2011) a través de tres etapas:

1. *Hidrólisis y acidogénesis.* En esta etapa diferentes tipos de bacterias se encargan de romper macromoléculas biológicas (proteínas, polisacáridos y lípidos) transformándolas en compuestos monoméricos o diméricos (aminoácidos, monosacáridos, disacáridos y ácidos grasos) que posteriormente son fermentados, produciendo ácidos grasos volátiles (AGV) como butirato, propionato, lactato y succinato; así como, dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno gaseoso (H₂) (Figura 2).

2. *Acetogénesis*. En esta etapa diferentes tipos de bacterias oxidan los AGV produciendo CO_2 y H_2 (Figura 2).
3. *Metanogénesis*. En esta etapa diferentes tipos de arqueas acetoclásticas rompen el acetato produciendo CH_4 y CO_2 , al mismo tiempo que diferentes tipos de arqueas hidrogenotróficas reducen el CO_2 con el H_2 produciendo CH_4 (Figura 2).

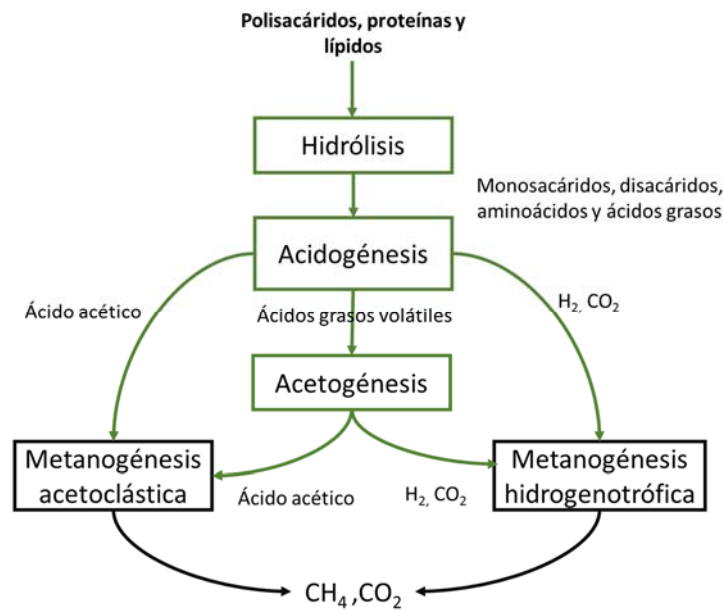


Figura 2. Digestión anaerobia
Esquema modificado de Li *et al.* 2011

1.1.3. Comunidades microbianas en la digestión anaerobia

Se le llama microbiota o comunidad microbiana a los virus, bacterias, arqueas y hongos que viven en un hábitat determinado. (Marchesi and Ravel 2015) La comunidad microbiana que biocataliza la DA durante el tratamiento de la FORSU es taxonómicamente y metabólicamente diversa (Shin *et al.* 2010; Li *et al.* 2013).

La biodiversidad de una comunidad microbiana es definida por dos elementos: el primero, la composición o riqueza, es decir, el número *taxa* (grupos de microorganismos) que en ella se encuentran, y el segundo, por su estructura, es decir, la proporción en la que se encuentran los *taxa* que la componen (Moreno 2001; Chernov *et al.* 2015).

La composición y la estructura de las comunidades microbianas durante la DA son afectadas por diversos factores como el tipo y concentración del sustrato, el pH, la humedad, la temperatura, etc. (Khalid *et al.* 2011).

La inhibición de la DA por la acidificación del medio se debe a que la alta concentración de materia orgánica en la FORSU lleva a una rápida producción de AGV y H₂ (Rodríguez *et al.* 2015; Lindner *et al.* 2015). Este problema, visto desde el enfoque de la ecología microbiana, se debe a la afectación de la relación simbiótica entre bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, en el que las primeras no pueden vivir con niveles altos de H₂, por lo que es muy importante que éste sea consumido por las segundas (Li *et al.* 2011).

Para resolver el problema, distintos autores recomiendan sistemas de digestión anaerobia en dos etapas (DA2E): la primera, de hidrólisis-acidogénesis, y la segunda, de acetogénesis-metanogénesis (Rodríguez *et al.* 2015; Lindner *et al.* 2015).

1.1.4. Análisis metataxonómico en la digestión anaerobia en dos etapas

El primer paso para conocer las interacciones que existen entre la microbiota y los microhábitat en un sistema de DA2E es mediante la caracterización de las comunidades microbianas y el monitoreo fisicoquímico del proceso (Marchesi and Ravel 2015).

Actualmente, el método más económico (con mayor rendimiento por menor costo) para estudiar la composición y estructura de las comunidades microbianas es el análisis metataxonómico; definido como un proceso de alto rendimiento basado en el análisis de genes biomarcadores en el que se asigna una clasificación taxonómica a los microorganismos de una comunidad microbiana (Marchesi and Ravel 2015).

El gen más utilizado como biomarcador para la caracterización de las comunidades microbianas procariontas (de bacterias y arqueas) es el gen *16S rRNA* debido a que se encuentra dentro del genoma de todos los procariontas y a que posee regiones conservadas y regiones hipervariables. Las primeras lo hacen un gen evolutivamente estable, y las segundas lo hacen útil para la diferenciación de organismos filogenéticamente lejanos y para la detección de organismos filogenéticamente cercanos (Aguirre 2005; Marchesi and Ravel 2015; D'Amore et al. 2016).

Un análisis metataxonómico consiste en la siguiente serie de pasos: recolección de muestras ambientales; extracción de *DNA*; secuenciación masiva de un gen biomarcador, y análisis bioinformático de las secuencias genéticas (Marchesi and Ravel 2015; Ju and Zhang 2015).

Para realizar un análisis metataxonómico de la DA2E en reactores escala piloto, es importante identificar los puntos en los que se encuentran las comunidades microbianas de interés.

La etapa de hidrólisis-acidogénesis es biocatalizada en reactores con alto contenido de sólidos orgánicos y con alta heterogeneidad de la mezcla reaccionante (Rodríguez *et al.* 2015), para conocer el efecto de esta heterogeneidad sobre la composición y estructura de la comunidad microbiana se requiere realizar un estudio estratificado.

La etapa de acetogénesis-metanogénesis es biocatalizada en un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (*UASB: Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket.*) y la comunidad microbiana de interés se encuentra principalmente en el lecho de lodo.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

Conocer la composición y estructura de las comunidades microbianas en la digestión anaerobia en dos etapas (DA2E) de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU).

1.2.2. Particulares

1. Determinar si las comunidades microbianas de las etapas hidrolítica-acidogénica y acetogénica-metanogénica son distintas entre sí.
2. Evaluar el efecto del tiempo sobre las estructuras de las comunidades microbianas en las dos etapas de la digestión anaerobia.
3. Conocer si existen cambios en las estructuras de las comunidades microbianas distribuidas en diferentes puntos de un reactor hidrolítico-acidogénico de lecho escurrido con alto contenido en sólidos orgánicos.
4. Con base en las condiciones de operación de un sistema de DA2E determinar los posibles roles metabólicos de los *taxa* microbianos más abundantes en las etapas hidrolítica-acidogénica y acetogénica-metanogénica.

1.3. Revisión bibliográfica

1.3.1. Caracterización de comunidades microbianas: contexto histórico

Las primeras descripciones de microbios fueron realizadas por Anton Van Leeuwenhoek en 1676 pero no fue sino hasta 1857 que Louis Pasteur describió por primera vez la importancia de los microorganismos en la realización de un proceso metabólico, la fermentación, usando el microscopio óptico como primera herramienta para la caracterización de microorganismos y su rol metabólico. Años después, en 1881 Robert Koch fue capaz de aislar una bacteria en un medio de cultivo, creando así, una herramienta valiosa para el estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de microorganismos.

Las dos técnicas enunciadas anteriormente fueron perfeccionadas con el paso del tiempo y con ellas, han sido estudiados y clasificados diferentes microorganismos aislados a partir de diferentes ecosistemas, dando como resultado manuales como el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* en el que se describen las principales características de las bacterias y arqueas conocidas.

Sin embargo, uno de los principales problemas al caracterizar comunidades microbianas con herramientas de microbiología clásica, es que la mayoría de los microorganismos que las componen tienen requerimientos nutrimentales complejos y por lo tanto muchos de estos no son cultivables aún (Rappé and Giovannoni 2003; Ju and Zhang 2015).

El uso de la biología molecular y la bioinformática para la caracterización de las comunidades microbianas ha permitido la caracterización de microorganismos no cultivables, complementando los estudios de microbiología tradicional (Ju and Zhang 2015).

Por ejemplo, la caracterización de comunidades microbianas en diferentes ecosistemas, se ha llevado a cabo durante los últimos veinte años con técnicas moleculares como: la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) junto con la secuenciación de Sanger; la hibridación fluorescente *in situ* (*FISH*); la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*DGGE*); los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal (*T-RFLP*).

Estas técnicas han enriquecido el conocimiento sobre las relaciones entre los diferentes grupos microbianos y el ambiente que habitan, es decir, sobre el interactoma; por ejemplo, ahora es sabido que los microorganismos raramente trabajan solos, y que usualmente forman biogránulos, biopelículas o flóculos facilitando las interacciones metabólicas de los consorcios microbianos durante la biodegradación y la producción de bioenergía (Ju and Zhang 2015).

En los últimos cinco años las técnicas moleculares mencionadas han sido superadas en costo y rendimiento por las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (*NGS: Next-Generation Sequencing*), también conocidas como de secuenciación masiva, y los investigadores han cambiado por completo la forma en que se diseñan experimentos para caracterizar las comunidades microbianas (D'Amore et al. 2016).

Las investigaciones basadas en *NGS* para describir la estructura de las comunidades microbianas se pueden clasificar en tres tipos: análisis metataxonómico; basado en la amplificación gen *16S rRNA* u otro gen biomarcador y la secuenciación masiva de los amplicones (productos de la amplificación); análisis metagenómico, basado en la secuenciación masiva del *DNA* metagenómico (secuenciación *shotgun*), y análisis metatranscriptómico, basado en la retrotranscripción del *RNA* total (transcriptómico) y la secuenciación masiva del *DNA* complementario (*cDNA*) retrotranscrito (Marchesi and Ravel 2015; D'Amore et al. 2016).

Durante los últimos años ha aumentado el número de investigaciones de la DA basadas en análisis metataxonómicos, metagenómicos y metatranscriptómicos y se ha mejorado el conocimiento sobre la adaptación, la composición, la estructura, los roles metabólicos y las interacciones simbióticas de las comunidades microbianas de la DA.

1.3.2. Adaptación de consorcios microbianos en la DA

Al iniciar la operación de un biodigestor los consorcios microbianos tienen un proceso de adaptación que se ve reflejado en los cambios de la estructura de la comunidad microbiana y en el aumento en la eficiencia de la hidrólisis-acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Poszytek *et al.* 2017 estudiaron la adaptación de inóculos de diferente procedencia en la DA de ensilaje de maíz monitoreando los cambios en la composición y estructura de las comunidades microbianas; reportaron que a medida que pasó el

tiempo los consorcios aumentaron su actividad hidrolítica y las comunidades microbianas, que en un principio eran biodiversamente distintas, comenzaron a ser similares, dominadas por las familias bacterianas Lactobacillaceae, Prevotellaceae y Veillonellaceae (Tabla 1).

Doloman *et al.* 2017 estudiaron la adaptación de un consorcio proveniente del sedimento de una laguna, y reportan que la composición y estructura de la comunidad microbiana cambió a medida se adaptó a la DA de biomasa microalgal y acetato de sodio, y al mismo tiempo, aumentó la eficiencia de las actividades hidrolítica, acidogénica y metanogénica (Tabla 1).

Alcántara *et al.* 2017 monitorearon la adaptación de un consorcio microbiano proveniente del lodo anaerobio de una planta de tratamiento de ARM a la DA de la FORSU en una etapa; observaron que durante el proceso de adaptación aumenta la abundancia relativa de grupos microbianos relacionados con la actividad hidrolítica (Tabla 1).

1.3.3. Factores que afectan la composición y estructura de las comunidades microbianas en la DA

La composición y la estructura de las comunidades microbianas se ven afectadas por factores como el TRH, TRS, procedencia del inóculo y la temperatura. Y son relativamente estables frente a la microbiota nativa del sustrato y con respecto al tiempo.

Jang *et al.* 2014 realizaron un análisis metataxonómico en la DA de FORSU en codigestión con aguas residuales, ellos reportaron que existen cambios en la composición y la estructura de las comunidades microbianas al cambiar el tiempo de residencia hidráulica (TRH), o en otras palabras, la carga orgánica de alimentación (Tabla 1).

Vanwonderghem *et al.* 2015 caracterizaron las comunidades microbianas durante la DA en una etapa de celulosa, y las principal conclusión de su estudio es que la composición de las comunidad microbianas durante la DA es afectada por la temperatura y por el tiempo de retención de sólidos (TRS) (Tabla 1).

Gaby *et al.* 2017 reportan que la composición y la estructura de las comunidades microbianas durante la DA2E de FORSU pasteurizada son afectadas por la temperatura y el TRH (Tabla 1).

Fisgativa *et al.* 2017, reportaron que la composición y la estructura de las comunidades microbianas en diferentes sustratos de la DA (residuos alimenticios de un comedor, residuos de un restaurante vegetariano, y FORSU recolectada de hogares) son distintas, sin embargo, Dennehy *et al.* 2017 reportaron que en la DA, la composición y estructura de las comunidades microbianas no son afectadas de manera significativa por la microbiota nativa en el sustrato (FORSU con excremento de cerdo). También corroboran que la composición de las comunidades microbianas es afectada por los cambios en el TRH (Tabla 1).

Pampillón *et al.* 2017 realizaron un análisis metataxonómico en la DA de residuos de granja porcina (principalmente heces) en una laguna anaerobia de 2700 m³; ellos reportan que la composición de la comunidad microbiana en el sustrato fue distinta a la del reactor y que esta última tienen la capacidad de biocatalizar las tres etapas de la DA (Tabla 1).

1.3.4. Similitudes entre las comunidades microbianas de diferentes sistemas de DA

La composición y la estructura de las comunidades microbianas son particulares a cada sistema, sin embargo, la similitud entre estas aumenta en sistemas con características de operación similares.

Kirkegaard *et al.* 2017 reportaron, basados en análisis metataxonómicos, que la composición y la estructura de las comunidades microbianas de 32 digestores anaerobios a escala industrial se mantuvieron estables durante 6 años, debido a que estas no fueron afectadas por la microbiota nativa en los sustratos. También reportan que para los digestores (anaerobios mesofílicos, termofílicos y mesofílicos con pretratamiento térmico-hidrolítico) ninguna comunidad microbiana es igual, pero que son más similares entre sí a medida que las condiciones de operación también son más similares (Tabla 1).

1.3.5. Taxa microbianos no caracterizados previamente en la DA

Li *et al.* 2013 caracterizaron las comunidades microbianas durante la DA en una etapa, de FORSU en estado sólido, por medio de un análisis metagenómico, en este sistema caracterizaron bacterias de los géneros *Psychrobacter* y *Anaerococcus*, con capacidad acetogénica, las cuáles no habían sido reportadas anteriormente, así mismo, Maus *et al.* 2016 reportaron que hay microorganismos que participan en la DA que aún no han sido caracterizados a nivel taxonómico de especie (Tabla 1) evidenciando que con estas técnicas se pueden descubrir nuevos microorganismos en la DA (Tabla 1).

1.3.6. Relación entre la abundancia de un taxón y su actividad metabólica en la DA

Maus *et al.* 2016 realizaron análisis metagenómico y metatranscriptómico durante la DA de residuos de agricultura y ganadería a escala industrial en condiciones termofílicas, e indican que la abundancia de los *Taxa* microbianos en la DA es directamente proporcional a su actividad transcripcional o metabólica, pero no siempre.

1.3.7. Disminución de bacterias coliformes en la DA

Dennehy *et al.* 2017 reportaron que en la DA de excremento de cerdo la cantidad de bacterias coliformes provenientes de éste, es reducida significativamente.

1.3.8. Proporción entre bacterias y arqueas en la DA

La mayoría de los autores citados reportan que durante la DA la abundancia relativa de bacterias (~ 90%) es mayor que la de arqueas (~ 10%).

1.3.9. Estudio previo

En un estudio previo, se caracterizó la comunidad bacteriana en la primera etapa de la DA de la FORSU rociada con ARM utilizando las técnicas *PCR-DGGE* y secuenciación Sanger. Se observó que las composiciones de las comunidades bacterianas del sustrato variaban en el tiempo y sin embargo, se mantenían estables en el reactor. (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios de la caracterización de comunidades microbianas en la DA.

Características del sistema de DA	Procedencia del inóculo y tipo de sustrato	Principales taxa microbianos caracterizados	Cita bibliográfica
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Escala laboratorio (2 L) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin inóculo • Alimentado con residuos de pollo (15%), heces de cerdo (42.5%) y lodo anaerobio residual (42.5%). 	<p>Especies microbianas</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aminobacterium colombiense</i>, • <i>Anaerococcus prevotii</i>, • <i>Syntrophomonas wolfei</i> • <i>Clostridium thermocellum</i> • <i>Methanosarcina barkeri</i> • <i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> • <i>Kosmotoga olearia</i> • <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> • <i>Psychrobacter cryohalolenti</i> • <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> • <i>Bacteroides NC</i> • <i>Clostridium tetani</i> • <i>Parabacteroides distasonis</i>, • <i>Enterobacter cloacae</i> • <i>Finegoldia magna</i> • <i>Methanoculleus marisnigri</i> • <i>Clostridium kluyveri</i> • <i>Alkaliphilus oremlandii</i> • <i>Methanosaeta thermophila</i> 	<p>(Li <i>et al.</i> 2013)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Escala laboratorio (6 L) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculado con lodo anaerobio proveniente de una planta de DA mesofílica. • Alimentado con FORSU y aguas residuales. 	<p>Phyla bacterianos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aminobacterium</i> • <i>NC Porphyromonadaceae</i> • <i>Bacteria NC</i> • <i>Clostridiales NC</i> <p>Ordenes de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Methanosarcinales</i> • <i>Methanobacteriales</i> • <i>Methanomicrobiales</i> 	<p>(Jang <i>et al.</i> 2014)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Escala laboratorio (4L y 2L). 	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculado a partir de reactores CSTR de DA de alfa-celulosa. • Alimentado con celulosa. 	<p>Géneros microbianos en:</p> <p>DA mesofílica a TRS de 12 días</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ruminococcus</i> • <i>Clostridium</i> • <i>Bacteroides</i> • <i>Methanosaeta</i> <p>DA mesofílica a TRS de 4 días</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Alkaliflexus</i> • <i>Fibrobacter</i> • <i>Ruminococcus</i> • <i>Methanoregulaceae</i> <p>DA termofílica a TRS de 12 y 4 días</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> • <i>Methanothermobacter</i> • <i>Methanobacterium</i> 	<p>(Vanwonterghem <i>et al.</i> 2015)</p>

Características del sistema de DA	Procedencia del inóculo y tipo de sustrato	Principales taxa microbianos caracterizados	Cita bibliográfica
<ul style="list-style-type: none"> • 2 etapas (sólo se caracterizó la comunidad bacteriana en la primera etapa). • Escala laboratorio (10 L) con 8L volumen útil. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin inóculo • Alimentado con FORSU • Rociada con ARM 	<p>Especies bacterianas en:</p> <p>Entrada FORSU</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fructobacillus fructosus</i> • <i>Leuconostoc mesenteroides</i> • <i>Tatumella citrea</i> • <i>Weissella koreensis</i> • <i>Weissella paramesenteroides</i> • <i>Weissella viridescens</i> <p>ARM</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter junii</i> <p>Salida</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus helveticus</i> • <i>Weissella gallinarum</i> • <i>Weissella acidophilus</i> 	<p>(Cuetero <i>et al.</i> 2015)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Escala industrial (105 m³) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin inóculo • Alimentado con ensilaje de maíz (56%), estiércol de cerdo (32%) levadura (6%) y estiércol vacuno (6%). 	<p>Géneros bacterianos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Defluviitoga</i> • <i>Anaerobaculum</i> • <i>Syntrophaceticus</i> • <i>Tepidanaerobacter</i> • <i>Halocella</i> • <i>Defluviitaleas</i> • <i>Cellulosibacter</i> • <i>Tepidimicrobium</i> • <i>Clostridium</i> cluster III • <i>Clostridium sensu stricto</i> • <i>Lactobacillus</i> <p>Géneros de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Methanoculleus</i> • <i>Methanosarcina</i> • <i>Methanobacterium</i> • <i>Methanothermobacter</i> • <i>Methanogenium</i> 	<p>(Maus <i>et al.</i> 2016)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dos etapas • Escala laboratorio (2.5 L y 6 L para las primera y segunda etapas, respectivamente) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inóculos proveniente de un digestor anaerobio mesofílico y uno termofílico de FORSU para primera y segunda etapa respectivamente. • Alimentado con FORSU pasteurizada. 	<p>Géneros microbianos en:</p> <p>Primera etapa (termofílica)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Thermoanaerobacterium</i> • <i>Ruminococcus</i> • <i>Coprothermobacter</i> • <i>Methanothermobacter</i> <p>Segunda etapa (mesofílica)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> • <i>Syntrophomonas</i> • <i>Methanobacterium</i> • <i>Methanoculleus</i> • <i>Methanospirillum</i> • <i>Methanosaeta</i> • <i>Methanosarcina</i> 	<p>(Gaby <i>et al.</i> 2017)</p>

Características del sistema de DA	Procedencia del inóculo y tipo de sustrato	Principales taxa microbianos caracterizados	Cita bibliográfica
<ul style="list-style-type: none"> Una etapa Escala laboratorio (1 L) 	<ul style="list-style-type: none"> Inóculo 1: efluente de un reactor de hidrólisis de ensilaje de maíz. Inóculo 2: estiércol de ganado. Inóculo 3: lodo anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales. Alimentado con ensilaje de maíz y agua mineral. 	<p>Familias bacterianas</p> <ul style="list-style-type: none"> Lactobacillaceae Prevotellaceae Veillonellaceae <p>No se reportaron taxa de arqueas</p>	(Poszytek <i>et al.</i> 2017)
<ul style="list-style-type: none"> Una etapa UASB escala laboratorio (32.4 L) 	<ul style="list-style-type: none"> Inoculado con sedimento de la laguna Logan ubicada en Tasmania Alimentado con biomasa microalgal y acetato de sodio. 	<p>Ordenes microbianos de:</p> <p>Bacterias hidrolíticas</p> <ul style="list-style-type: none"> Pseudomonadales Enterobacteriales Bacteroidales <p>Bacterias acidogénicas/acetogénicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Clostridiales Thermotogales Desulfovibrionales <p>Arqueas metanogénicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Methanosarcinales Methanomicrobiales 	(Doloman <i>et al.</i> 2017)
<ul style="list-style-type: none"> Una etapa Escala piloto (7.5 L de volumen útil) 	<ul style="list-style-type: none"> Inoculado con digestato producido en la DA de estiércol vacuno. Alimentado con FORSU y estiércol de cerdo. 	<p>Géneros bacterianos</p> <ul style="list-style-type: none"> Bacteroidales NC Porphyromonadaceae NC Anaerolinaceae NC <i>Clostridium</i> <p>Géneros de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanoculleus</i> 	(Dennehy <i>et al.</i> 2017)
<ul style="list-style-type: none"> 20 diferentes sistemas de DA (32 reactores escala industrial) 	<ul style="list-style-type: none"> Alimentados con aguas residuales 	<p>Géneros de bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> T78 Candidatus <i>Microthrix</i> <i>Tetrasphaera</i> G35_D8 B55_F <i>Coprothermobacter</i> <i>Thermovirga</i> <i>Gelria</i> <p>Géneros de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Methanosaeta</i> <i>Methanothermobacter</i> <i>Methanolinea</i> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanospirillum</i> 	(Kirkegaard <i>et al.</i> 2017)

Características del sistema de DA	Procedencia del inóculo y tipo de sustrato	Principales taxa microbianos caracterizados	Cita bibliográfica
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Reactores CSTR • Escala laboratorio (5 L) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculado con lodo anaerobio de un biorreactor de tratamiento de aguas residuales operado a 33 °C. • Alimentado con FORSU. 	<p><i>Phyla</i> bacterianos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteobacteria • Bacteroidetes • Chloroflexi • Spirochaetes • Firmicutes • Synergistetes <p><i>Phyla</i> de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Euryarchaeota 	(Alcántara <i>et al.</i> 2017)
<ul style="list-style-type: none"> • Una etapa • Laguna anaerobia • Escala industrial (2,700 m³) • Localización: 19° 07' N 98° 22' O a 2,230 msnm 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin inóculo. • Alimentado con residuos de granja porcina (principalmente heces): agua en relación 1:6 - 1:10. 	<p>Géneros bacterianos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ruminococcaceae</i> NC • <i>Prevotella</i> • <i>Clostridium</i> • <i>BA021 (OP9)</i> • <i>Clostridiaceae</i> NC • <i>Bacteroidales</i> NC • <i>Candidatus Cloacamonas</i> <p>Géneros de arqueas</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Methanolobus</i> • <i>Methanosarcina</i> • <i>Methanospirillaceae</i> • <i>Methanosaeta</i> • <i>Methanospirillum</i> 	(Pampillón <i>et al.</i> 2017)

Actualmente se desconoce si existen variaciones en la composición y estructura de las comunidades microbianas debido a su distribución espacial en reactores de DA con alto contenido de sólidos orgánicos.

1.4. Hipótesis

- Las estructuras de las comunidades microbianas de la etapa hidrolítica-acidogénica, distribuidas en diferentes puntos de un biorreactor con alto contenido de sólidos orgánicos, serán distintas.
- Si las etapas hidrolítica-acidogénica y acetogénica-metanogénica son operadas bajo condiciones estables, las estructuras de las comunidades microbianas serán relativamente estables en el tiempo.

2. Material y métodos

2.1. Muestreo

2.1.1. Características del sistema de DA en dos etapas de la FORSU^a

Para realizar el análisis metataxonómico de la DA2E de la FORSU, se estudió el proceso utilizado en la UAM Iztapalapa a nivel piloto. La primera se lleva a cabo en un reactor de hidrólisis-acidogénesis de lecho escurrido (RHALE) en donde la FORSU, proveniente de la cafetería local, es solubilizada y degradada a sustancias hidrosolubles (AGV, carbohidratos, proteínas) contenidas en una corriente de lixiviados; la FORSU no solubilizada es llamada digestato. En la segunda etapa los lixiviados son alimentados a un reactor *UASB* que también trata las aguas residuales de la unidad universitaria para ser transformados en biogás durante la acetogénesis-metanogénesis (Figura 3).

La planta piloto 9, en la que se encuentra el sistema de DA2E está ubicada geográficamente a una latitud y una longitud de 19° 21' 41" N y 99° 4' 22" O respectivamente, y a una altitud de 2,239 m sobre el nivel del mar. El sistema es operado a temperatura ambiente, que durante el periodo de estudio fue de 23/12 °C día/noche.

^a Los datos sobre las condiciones de operación del sistema de DA2E de FORSU durante los 30 días de estudio fueron brindados por la I.B.I. Adriana Reyes Regalado

El RHALE fue operado a un TRS de 78 d y el UASB a un TRH de 33 h, al inicio del estudio llevaban 14 meses y 27 años respectivamente de haber iniciado operación, que es interrumpida durante los periodos vacacionales, por lo que el sistema llevaba 149 días de reinicio de operación.

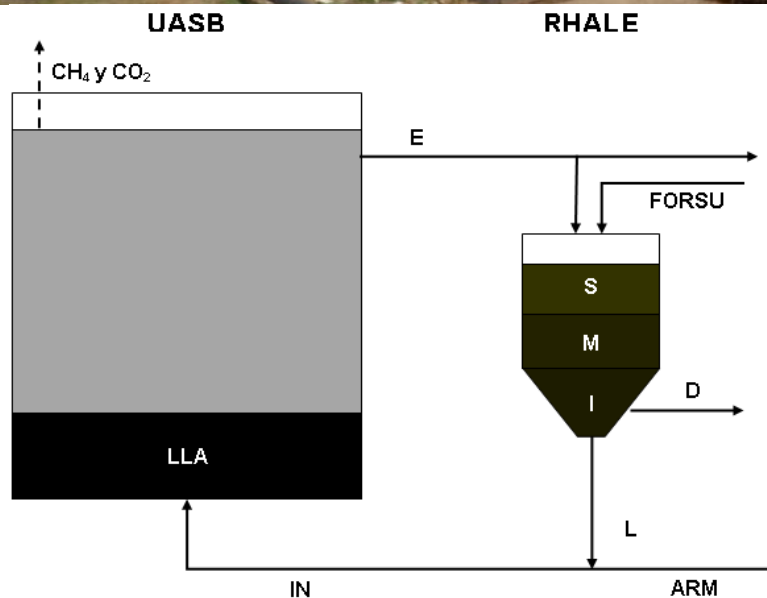


Figura 3. Digestión anaerobia en dos etapas (DA2E) de la FORSU

ARRIBA. Fotografía del sistema de DA2E de la FORSU de la UAM Iztapalapa. **UASB:** *Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket*) Reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente de 60 m³. **RHALE)** Reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido de 3.5 m³. **ABAJO.** Esquema de la DA2E. **FORSU)** Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos; **L)** Lixiviado, **D)** Digestato **ARM)** Aguas residuales municipales, **IN)** Influyente del UASB **LLA)** Lecho de lodo anaerobio, **CH₄)** Metano, **CO₂)** Dióxido de carbono y **E)** Efluente del UASB. **S, M e I)** Estratos superior, medio e inferior del RHALE respectivamente

2.1.2. Muestreo estratificado en el RHALE

Para conocer el efecto de la altura sobre la composición y la estructura de las comunidades microbianas en el RHALE se tomaron muestras de masa de FORSU en proceso a alturas específicas del reactor. Para llevar a cabo lo anterior sin alterar las composiciones física y microbiológica del lecho se diseñó un muestreador (Anexo A. Aparato para muestreo estratificado en el RHALE.).

El muestreo estratificado en el RHALE consistió en la siguiente serie de pasos:

1. Seccionamiento del RHALE

1.1. Se seccionó el RHALE en 3 diferentes estratos: inferior, medio y superior (Figura 3 y Tabla 2).

1.2. Se seccionó la superficie del RHALE en cuadrantes de 10 x 10 cm (Figura 4).



1	2	3	4	5				66	67	68	69	70
6	7	8	9	10				71	72	73	74	75
11	12	13	14	15				76	77	78	79	80
16	17	18	19	20				81	82	83	84	85
21	22	23	24	25				86	87	88	89	90
26	27	28	29	30				91	92	93	94	95
31	32	33	34	35				96	97	98	99	100
36	37	38	39	40				101	102	103	104	105
41	42	43	44	45				106	107	108	109	110
46	47	48	49	50				111	112	113	114	115
51	52	53	54	55				116	117	118	119	120
56	57	58	59	60				121	122	123	124	125
61	62	63	64	65				126	127	128	129	130

Figura 4. Seccionamiento de la superficie del RHALE

Izquierda) Fotografía, **Derecha)** Esquema de los cuadrantes de 10 x 10 cm de la superficie del RHALE, la parte azul oscuro corresponde a la tubería para rociar el lecho, lo que impide que se tomen muestras en esa zona.

Tabla 2. Origen y etiquetas de las muestras de estudio.

			Día de muestreo		
			Día 1 27/06/16	Día 15 12/07/16	Día 30 27/07/16
Punto de muestreo	Reactor Hidrolítico Anaerobio de Flujo Ascendente (RHALE)	Estrato superior (A 30 cm de la superficie del lecho)	SUPERIOR01	SUPERIOR15	SUPERIOR30
		Estrato medio (A la mitad de la altura del lecho)	MEDIO01	MEDIO15	MEDIO30
		Estrato inferior (A 10 cm del fondo del lecho)	INFERIOR01	INFERIOR15	INFERIOR30
	Reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB)	A la mitad del lecho de lodo anaerobio de 2m.	UASB01	UASB15	UASB30

2. Toma de muestra en cada estrato en el orden: 1) Superior, 2) Medio e 3) Inferior.
 - 2.1. Se seleccionaron aleatoriamente 3 cuadrantes entre el 1 y el 130 (Figura 4).
 - 2.2. Se introdujo el muestreador (Anexo A. Aparato para muestreo estratificado en el RHALE.), con el recipiente colector cerrado, al estrato del RHALE en el primer punto aleatorio seleccionado.
 - 2.3. Se abrió el recipiente colector y se cerró después de 20 segundos, tiempo suficiente para que la FORSU entrara al recipiente.
 - 2.4. Se expulsó el aparato de muestreo.
 - 2.5. Se vertió la FORSU recolectada a un vaso de plástico (nuevo) 0.5 L.
 - 2.6. Se introdujo el vaso a una caja de unicel con hielo.
 - 2.7. Se lavó con agua potable el recipiente colector y la tapa.
 - 2.8. Se repitieron los pasos del 2.2 al 2.7 para los 2 cuadrantes seleccionados. faltantes, vertiendo el lodo al mismo recipiente.
 - 2.9. Se mezcló la FORSU recolectada de los tres cuadrantes dentro del vaso.
 - 2.10. Se vertieron 45 ml FORSU mezclada en un tubo Falcon estéril de 50 ml, se tapó y se colocó en hielo.

2.11. Se desechó el recipiente colector y se reemplazó por otro limpio.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio y se conservaron a -20 °C.

2.1.3. Colecta de lodo del *UASB*

Con la finalidad de tener una muestra representativa de la comunidad microbiana de la etapa acetogénica-metanogénica se colectó lodo anaerobio (Tabla 2).

2.1.4. Muestreo a través del tiempo

Debido al tiempo de retención hidráulica (TRH) de 33 horas del *UASB* y el tiempo de retención de sólidos (TRS) de 78 días del RHALE y con el propósito de obtener un recambio de la materia orgánica que alimenta al sistema de DA2E, se muestreó cada 15 días obteniendo muestras para los días 1, 15 y 30 de este estudio (Tabla 2).

2.2. Extracción de *DNA*

Se utilizó el *PowerSoil® DNA Isolation Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3. Análisis de *DNA*

Consistió en la siguiente serie de pasos:

1. **Visualización de *DNA*** por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x, utilizando el marcador de peso molecular *1KB DNA Ladder Promega* (Anexo B. Electroforesis en gel de agarosa).

2. **Medición de concentración y determinación de pureza de los *DNA* extraídos** con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000-Thermo Scientific (Anexo C. Cuantificación del *DNA* con NanoDrop).
3. **Amplificación por *PCR* del gen *16S rRNA*** para probar que los *DNA* extraídos tenían la calidad suficiente para ser enviados a servicios de secuenciación masiva del gen *16S rRNA*. Para bacterias, se utilizó el par de *primers* GC968f y 1401r que codifican para las regiones V6-V8 y para arqueas el par de *primers* Arq571f y Arq1017r, que codifican para las regiones V4-V6 (Anexo D. Amplificación del gen *16S rRNA* de arqueas y bacterias).

2.4. Secuenciación masiva del gen *16S rRNA*

Se prepararon alícuotas de 10µL de todos los *DNA* extraídos a una concentración de 10ng/µL y se enviaron al *Centre for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics (CGEB)* en Canadá, que cuenta con la plataforma de NGS Illumina MiSeq. Con base en los análisis de los *DNA* extraídos, se solicitaron:

- La secuenciación masiva las regiones V6-V8 del gen *16S rRNA* de bacterias.
- La secuenciación masiva las regiones V6-V8 del gen *16S rRNA* de arqueas.

2.5. Análisis bioinformático y bioestadístico

Una vez obtenidos los paquetes de secuencias de los servicios de secuenciación masiva, se realizaron dos análisis bioinformáticos; uno para las secuencias de bacterias y otro para las secuencias de arqueas, para ambos se siguió la metodología que se describe a continuación.

2.5.1. Análisis de calidad y selección de secuencias

Utilizando el software bioinformático Mothur (Schloss *et al.* 2013) se alinearon las secuencias *forward* y *reverse*, se crearon secuencias contiguas y posteriormente se seleccionaron aquellas que cumplieran los siguientes parámetros de calidad: para arqueas, longitud entre 420 y 440 bases; para bacterias, longitud, entre 435 y 445 bases, y para ambas, sin bases ambiguas y con secuencias homopoliméricas menores a 8 bases (Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur).

2.5.2. Clasificación de secuencias.

Utilizando el software bioinformático Mothur y la base de datos SILVA (Quast *et al.* 2013) y con una similitud mayor al 80%; se clasificaron las secuencias como pertenecientes a unidades taxonómicas operacionales (UTO) a los niveles taxonómicos de Dominio, *Phyla* Clase, Orden, Familia y Género (Anexo E. Análisis

bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur).

2.5.3. Análisis de esfuerzo de secuenciación

Con la finalidad de conocer si el número de secuencias fueron suficientes para cubrir toda la diversidad bacteriana y de arqueas a nivel taxonómico de género en las muestras, se calcularon las curvas de rarefacción con el programa Mothur (Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur).

Posteriormente, con las tablas de rarefacción obtenidas y utilizando el paquete estadístico NCSS se realizaron análisis de regresión no lineal basados en la función de acumulación de especies de Clench (Moreno 2001), la cual fue modificada para crear una función de UTO caracterizadas como se muestra a continuación:

Ecuación 1

Dónde:

$$nOTUs = \frac{a * nseqs}{1 + b * nseqs}$$

$nUTO$ = Número de UTO caracterizadas.

$nseqs$ = Número de secuencias obtenidas.

$\frac{a}{b}$ = Asíntota (riqueza total de UTO de la comunidad microbiana).

2.5.4. Cálculo de estimadores de biodiversidad

Se calcularon los estimadores de biodiversidad de Shannon, Chao y Simpson con el software bioinformático Mothur (Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur).

2.5.5. Elaboración de gráficos de composición y estructura de las comunidades microbianas

Se utilizaron la plantilla Krona para Excel (Ondov *et al.* 2011), el paquete bioinformático STAMP (Parks *et al.* 2014) y el software estadístico JMP de SAS para realizar diferentes gráficos de composición y estructura de las comunidades microbianas.

2.5.6. Análisis multivariable para las diferentes muestras

Con la finalidad de conocer la relación que existe entre la composición y la estructura de las comunidades microbianas de los diferentes puntos de muestreo, se realizó un análisis multivariable de correlaciones con el software estadístico JMP de SAS.

Con la finalidad de agrupar las muestras en un plano de acuerdo a su similitud-diferencia de composición y de estructura de la comunidad bacteriana o de arqueas, así como, conocer cuáles son las UTO microbianas que tienen mayor peso en el patrón de agrupamiento de las muestras, se realizaron análisis de componentes principales (*PCA*: por sus siglas en inglés) con el software estadístico JMP de SAS.

2.5.7. AMOVA

Con la finalidad de conocer si había diferencias significativas en la abundancia relativa de secuencias de las UTO bacterianas^b más abundantes entre los diferentes puntos de muestreo y entre los diferentes tiempos, se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) y pruebas de Tukey con un $\alpha=0.1$ utilizando el software estadístico JMP de SAS.

^b No se realizó esto para los géneros de arqueas debido a que sólo se realizó la secuenciación masiva del gen *16S rRNA* de arqueas para las muestras SUPERIOR15, SUPERIOR30, UASB01, UASB15, UASB30 y por lo tanto no hubo datos suficientes.

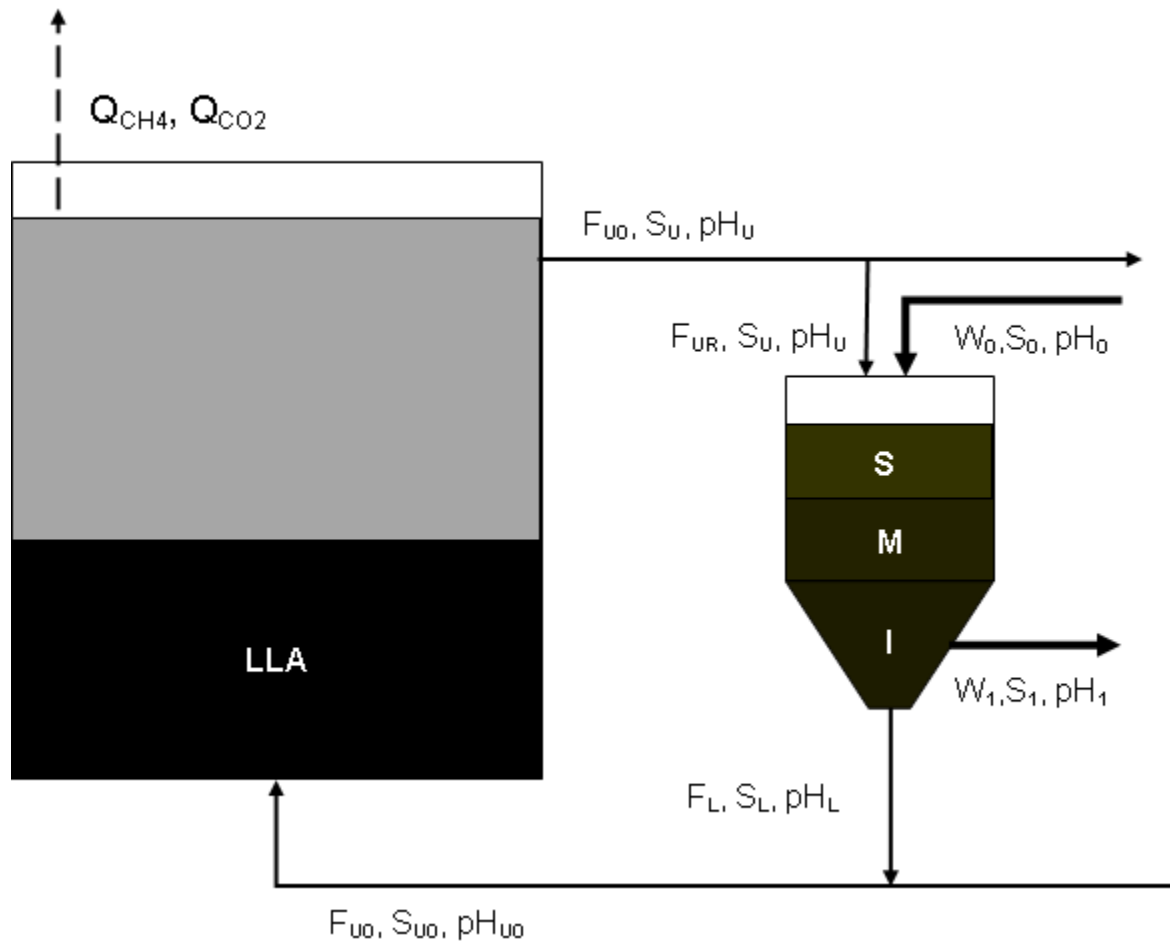
3. Resultados y análisis

3.1. Condiciones de operación del sistema de digestión anaerobia en dos etapas de FORSU

Con el objetivo de conocer los factores abióticos en que se desarrollaron las comunidades microbianas del sistema de DA2E de FORSU, a continuación se describen y analizan algunos parámetros fisicoquímicos del mismo.

Se considerarán como: entradas del RHALE, al efluente del *UASB* para rociado (UR) y a la FORSU (0); y salidas del RHALE, al lixiviado (L) y al digestato (1) (Figura 5).

Así mismo la entrada del *UASB* es el influente compuesto por lixiviado y aguas residuales municipales (U0) y la salida del *UASB* es el efluente de aguas tratadas (U) (Figura 5).



UASB
Segunda etapa:
acetogénica-metanogénica

RHALE
Primera etapa:
hidrolítica-acidogénica

Parámetro	Magnitud	Parámetro	Magnitud
F_{U0} : Flujo de influente y efluente del UASB	43,400 L/d	W_0 : Cantidad de FORSU.	1,197 kg
S_{U0} : Concentración de DQO en el influente del UASB	233±93 mg/L	S_0 : Concentración de DQO en la FORSU.	172±48 g/kg
pH_{U0} : Del influente del UASB	8.1±0.4	pH_0 : De la FORSU	5.3±0.5
S_U : Concentración de DQO en el efluente del UASB	0.24±0.1 g/L	W_1 : Cantidad de Digestato.	293 kg
pH_U : Del efluente del UASB	8.1±0.3	S_1 : Concentración de DQO en el digestato.	95±27 g/kg
Q_{CH4} : Producción de metano.	~102,672 L	pH_{w1} : Del digestato	5.1±0.3
Q_{CO2} : Producción de dióxido de carbono.	~68,120 L	F_{UR} : Flujo del efluente del UASB para rociado del RHALE.	120 L/d
Abreviaturas		F_L : Flujo de lixiviado.	144 L/d
LLA) Lecho de lodos anaerobios.		S_L : Concentración de DQO en el lixiviado.	38±12 g/L
Estratos S) Superior, M) Medio e I) Inferior.		pH_L : Del lixiviado	5.3±0.8

Figura 5. Condiciones de operación del sistema de DA2E de la FORSU

3.1.1. Etapa hidrolítica-acidogénica en el RHALE

Estabilidad del pH

El pH del RHALE se mantuvo estable. Los valores promedio de pH de la FORSU, del efluente del *UASB*, del digestato y del lixiviado fueron 5.3 ± 0.5 , 8.1 ± 0.3 , 5.1 ± 0.3 y 5.3 ± 0.8 respectivamente (Figura 6).

Bajo condiciones similares, es decir, a pH de 5.1 ± 0.6 Rodríguez *et al.* 2015 obtuvieron eficiencias de eliminación de DQO del 61 ± 1 en un RHALE de 10 L.

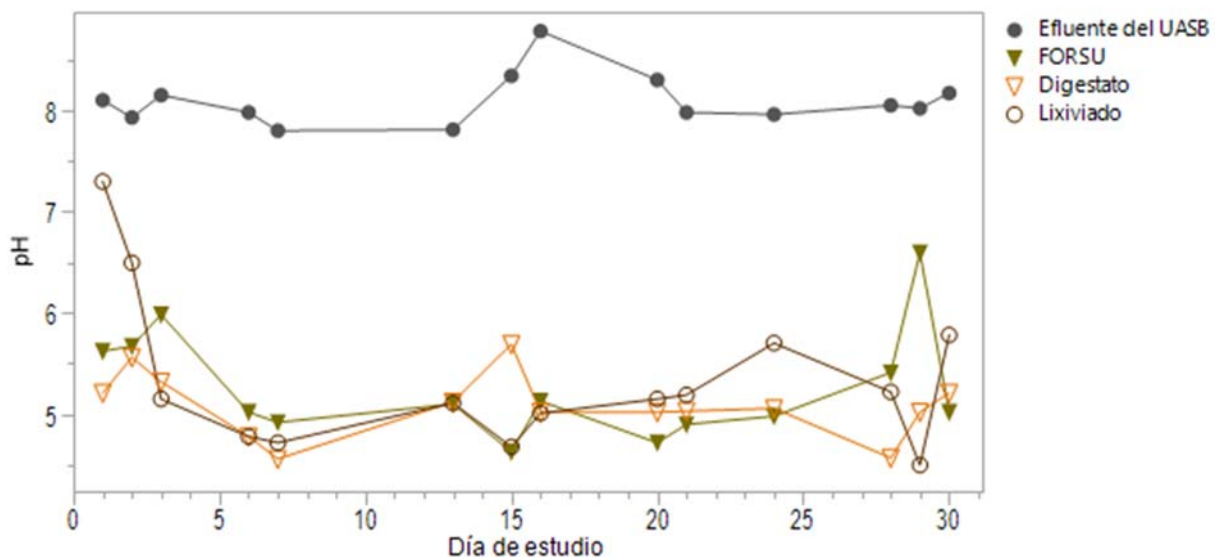


Figura 6. pH de las entradas y salidas del RHALE

Eliminación de la FORSU

El RHALE fue operado en semicontinuo y fueron tratados 1,196 kg de FORSU (W_0), produciendo 293 kg de digestato (W_1) (Figura 7), obteniéndose la eficiencia de eliminación de la FORSU (η_{W_0}) fue del 75%.

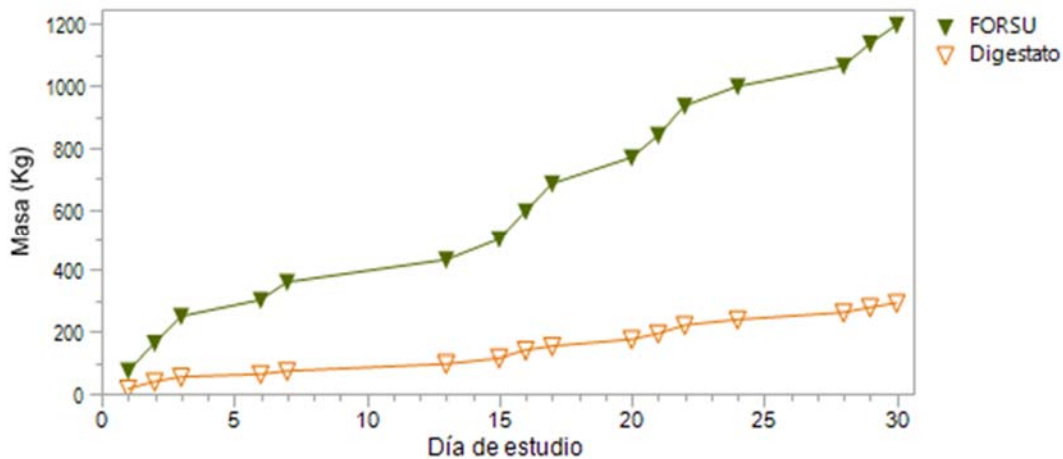


Figura 7. Masa acumulada de FORSU y digestato

Producción de lixiviado

Se produjeron 4,331 L de lixiviado, que corresponde a un flujo (F_L) de 144 L/d.

Eliminación de DQO

La DQO total de entrada al RHALE (DQO_{t_E}) fue 205 kg y la de salida (DQO_{t_S}) fue de 193 kg (Tabla 3, Figura 8).

Tabla 3. Balance de DQO en el RHALE

Parametro fisicoquímico	ENTRADA		SALIDA	
	Efluente del UASB	FORSU de entrada	Lixiviado	Digestato
Concentración de DQO	$S_U = 0.24$ g/L	$S_0 = 172$ g/kg	$S_L = 39$ g/L	$S_1 = 95$ g/kg
Cantidad (kg)	NA	$W_0 = 1,197$	NA	$W_1 = 293$
Flujo (L/30 días)	$F_{UR} = 3,600$ L/30d	NA	$F_L = 144$ L/d	NA
DQOt (kg)	$DQO_{t_{UR}} = 0.9$	$DQO_{t_0} = 204$	$DQO_{t_L} = 165$	$DQO_{t_1} = 28$
	$DQO_{t_E} = 205$		$DQO_{t_S} = 193$	
Eficiencia (%)			$\eta_L = \frac{DQO_{t_L}}{DQO_{t_0}} = 81$	$\eta_1 = \frac{DQO_{t_1}}{DQO_{t_0}} = 13$
			$\eta_{DQO} = \frac{DQO_{t_E} - DQO_{t_1}}{DQO_{t_E}} = 86$	$DQO_{NC} = 100\eta_L - \eta_1 = 6$

La eficiencia de eliminación de DQO (η_{DQO}) fue 86.5%, así mismo la DQO de la FORSU transferida al lixiviado (η_L) fue 81%, la retenida en el digestato (η_1) fue 13%

y la no contabilizada (DQO_{NC}) 6% (Tabla 3, Figura 8). Es posible que la DQO_{NC} corresponda a H_2 (Narihiro and Sekiguchi 2007; Khalid *et al.* 2011).

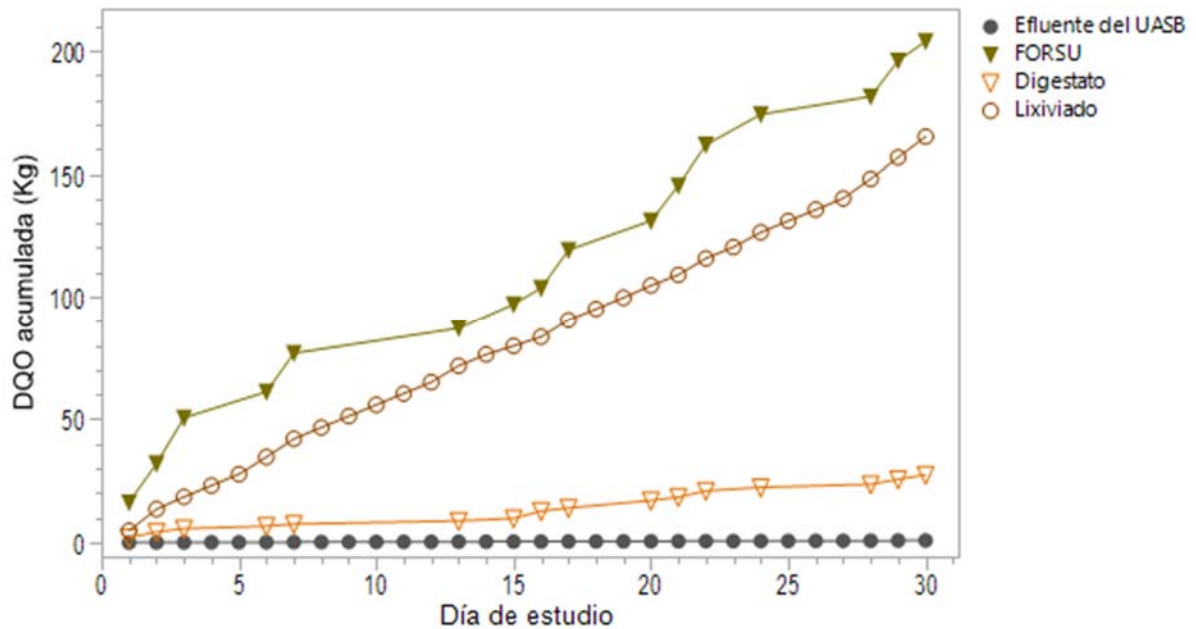


Figura 8. DQO acumulada de las entradas y salidas del RHALE

3.1.2. Etapa acetogénica- metanogénica en el *UASB*

Estabilidad del pH

La comunidad microbiana del reactor *UASB* se desarrolló a pH estable. Los pH del influente y el efluente fueron de 8.1 ± 0.4 y 8.1 ± 0.3 respectivamente (Figura 9).

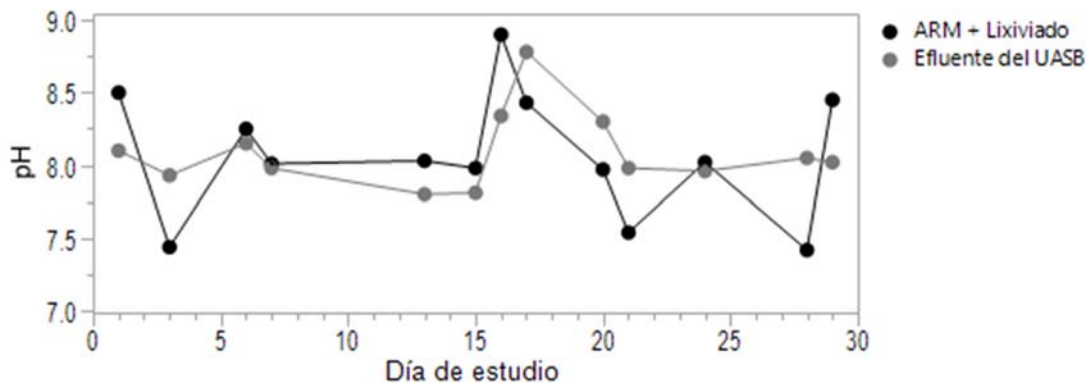


Figura 9. pH de la entrada y salida del *UASB*

Flujo de influente

El flujo de influente (F_{U0}) fue 43,400 L/d del cual el 0.33% correspondió al flujo de lixiviado (F_L) que fue de 144 L/d , estos es conveniente para la segunda etapa de la DA ya que un flujo de lixiviado mayor o igual que un flujo de ARM podría acidificar el medio e inhibir la actividad metanogénica (Khalid *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2015)

Eliminación de DQO

Las concentraciones de DQO del influente y del efluente del *UASB* fueron de 650 ± 156 y 233 ± 93 mg/L respectivamente (Figura 10). La DQO de entrada por día en el *UASB* ($DQO_{t_{U0}}$) fue 28.21 kg y la de salida (DQO_m) fue de 10.11 kg (Tabla 4).

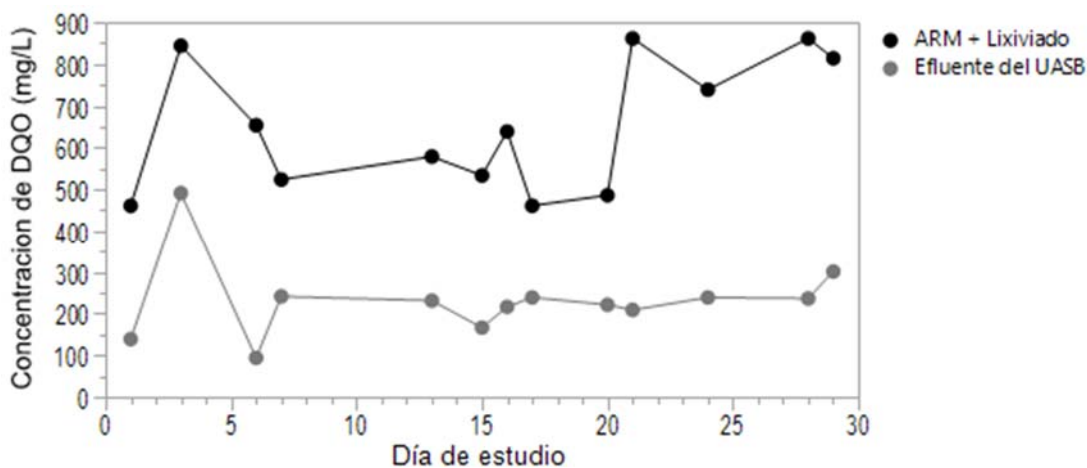


Figura 10. Concentraciones de DQO en la entrada y salida del *UASB*

A pesar de que el flujo del lixiviado corresponde a sólo el 0.3% del flujo del influente; de la DQO que alimentó al reactor el 20% fue aportado por el lixiviado (Tabla 4).

Tabla 4. Balance de DQO para el UASB

Parámetro fisicoquímico	ENTRADA		SALIDA
	Influyente (ARM + Lixiviado)	Lixiviado	Efluente del UASB
Concentración de DQO (mg/L)	$S_{U0} = 650$	$S_L = 38,800$	$S_U = 233$
Flujo (L/ días)	$F_{U0} = 43,400$	$F_L = 144$	$F_m = 43,400$
DQOt (kg)	$DQOt_{U0} = 28.21$	$DQOt_L = 5.6$	$DQOt_m = 10.11$
Eficiencia (η)			$\eta_{DQO} = \frac{DQOt_{U0} - DQOt_m}{DQOt_{U0}} = 64\%$

La eficiencia de remoción de DQO durante la etapa acetogénica-metanogénica (η_{DQO}) fue del 64%, lo que indica una alta actividad hidrolítica-acidogénica y acetogénica en esta etapa de la DA (Rodríguez *et al.* 2015)

Eliminación de amonio

Las concentraciones de amonio (NH_4) para el influente y el efluente del UASB fueron de 344 ± 135 y 233 ± 109 mg/L respectivamente (Figura 11) esta concentración de amonio no fue lo suficientemente alta para inhibir el proceso de metanogénesis (Rodríguez *et al.* 2015).

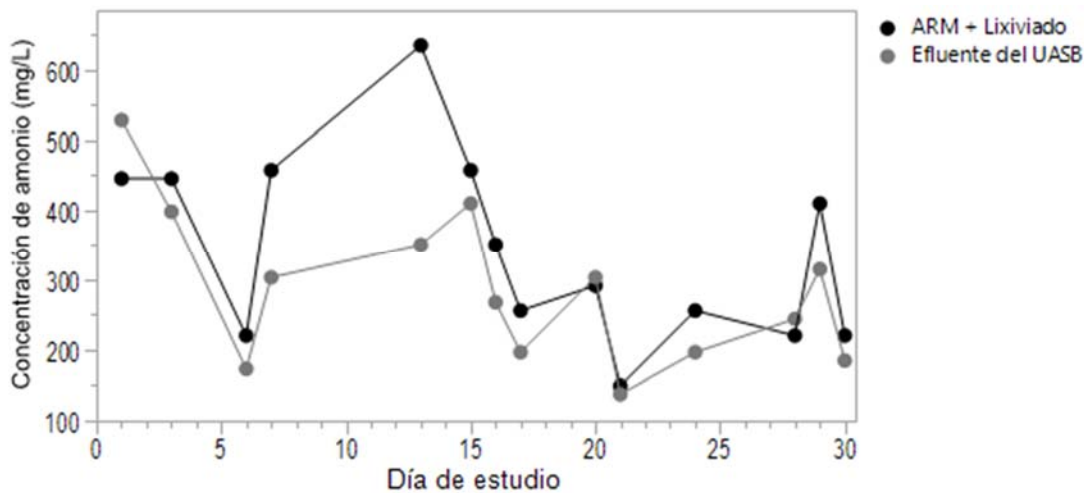


Figura 11. Concentración de amonio en la entrada y salida del UASB

Producción de biogás

Se produjeron $5,704 \pm 2,015$ L de biogás por día, cuya composición fue de 60% CH_4 y 40% CO_2 (Figura 12), por consiguiente, durante el periodo de estudio la producción de CH_4 fue de (Q_{CH_4}) fue de $\sim 102,672$ L y la de CO_2 (Q_{CO_2}) fue de $\sim 68,120$ L. Tomando en cuenta que $DQOt_{U0}$ fue 28.21 kg se obtuvo un rendimiento de 3,300 $\text{L}_{\text{CH}_4}/\text{Kg}_{\text{DQOU0}}$.

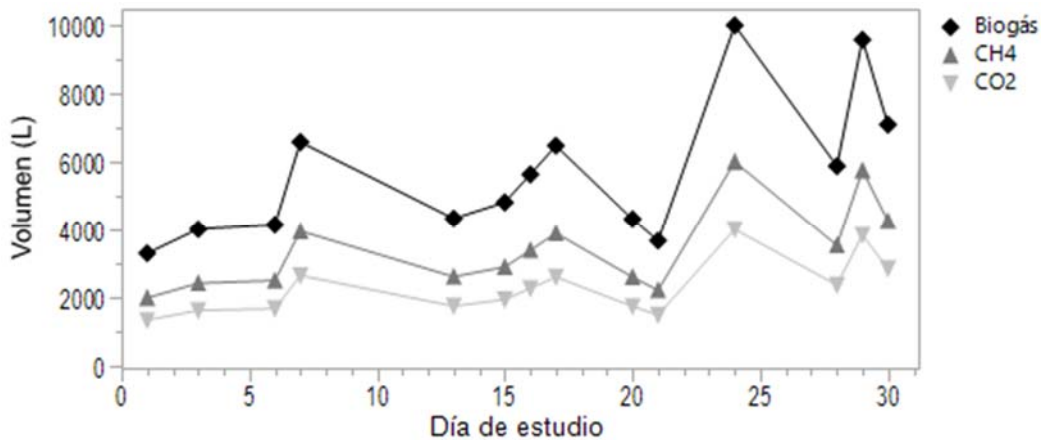


Figura 12. Producción de biogás en la etapa acetogénica-metanogénica

3.2. Extracción y análisis de *DNA*

Por medio de la electroforesis en gel de agarosa solamente se visualizaron las bandas correspondientes al *DNA* con tamaño mayor a 10,000 pb extraído de las muestras del lecho del lodo anaerobio del *UASB*; no fue posible visualizar bandas correspondientes al *DNA* de las muestras del *RHALE* (Figura 13). Sin embargo, se determinó con el NanoDrop que para todos los *DNA* extraídos se obtuvieron concentraciones mayores a 10 ng/μL (Tabla 5).

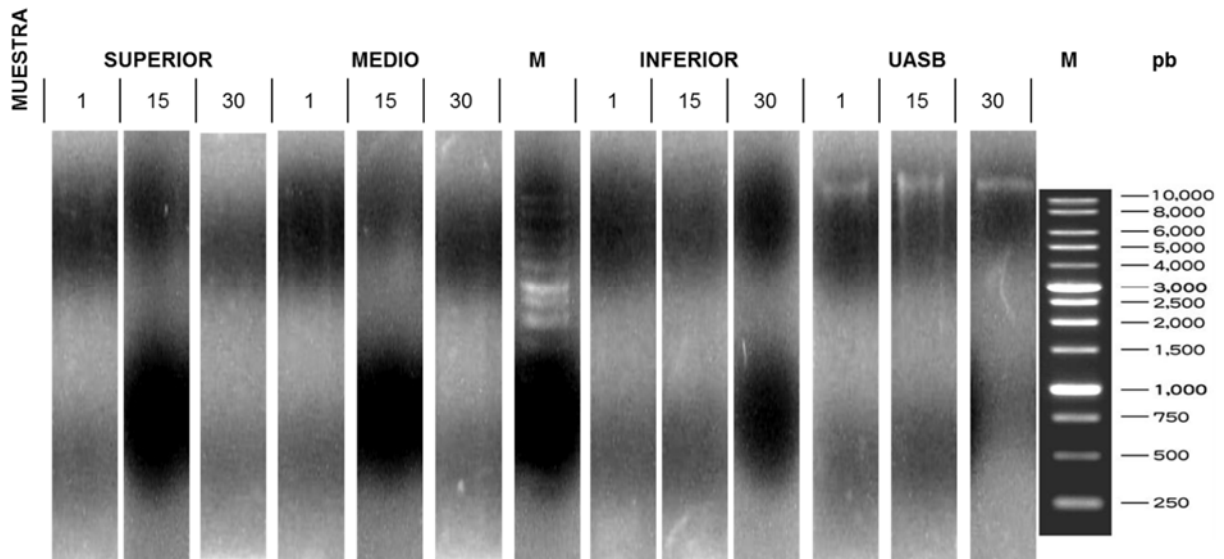


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los *DNA* extraídos

M) Marcador de peso molecular 1kb *DNA* Ladder de Promega y **pb)** Pares de bases.

Con respecto a la determinación de pureza de los *DNA* extraídos, el rango de los valores del índice A_{260}/A_{280} fue de 1.82 a 2.53 (Tabla 5); ya que no hubo valores menores a 1.8 no se consideran contaminados con proteínas (Tanveer *et al.* 2016).

Tabla 5. Concentración y pureza de los DNA

Origen del DNA	Día de muestreo	Concentración (ng/ μ L)	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Estrato Superior	1	23.7	1.88	0.89
	15	18.3	2	0.91
	30	17.1	1.89	0.89
Estrato Medio	1	12.2	1.89	0.63
	15	24.4	1.86	1.07
	30	11	2.08	0.64
Estrato inferior	1	10.6	2.16	0.67
	15	16.9	1.98	0.9
	30	16.6	1.85	0.79
Lodo del UASB	1	23.7	2.53	0.95
	15	24.4	1.88	0.93
	30	35.2	1.82	1.06

Así mismo, el rango de los valores del índice A_{260}/A_{230} fue de 0.63 a 1.07, estos valores se encuentran muy por debajo de valor 2.0 (considerado como valor de DNA puro), por lo que es posible que en todos los DNA extraídos haya contaminantes no proteicos como carbohidratos, ácidos o ambos (Tanveer *et al.* 2016; Li *et al.* 2013).

Los valores de los índices aquí reportados son similares a los obtenidos en una investigación en la que se extrajo DNA de un reactor de DA de FORSU en estado sólido utilizando el *Mo-Bio PowerSoil DNA Isolation Kit* (Li *et al.* 2013), en el que los autores de dicho estudio optaron por utilizar otro Kit de extracción de DNA.

Es sabido que la calidad del DNA afecta al rendimiento de la amplificación del gen *16S rRNA* y al esfuerzo de secuenciación (Vo and Jedlicka 2014; Li *et al.* 2013); sin embargo, mientras el DNA se pueda amplificar, no afecta sobre los perfiles de la composición y la estructura de las comunidades microbianas a analizar (Rubin *et al.* 2014) por lo que se continuó a realizar la prueba de amplificación del gen *16S rRNA*.

3.2.1. Amplificación del *DNA* de bacterias

Se amplificaron mediante *PCR* las regiones V6-V8 del gen *16s rRNA* bacteriano obteniendo amplicones para todos los *DNA* extraídos (Figura 14), confirmando así la presencia de *DNA* bacteriano en todos los puntos y días de muestreo en el sistema de DA2E de FORSU.

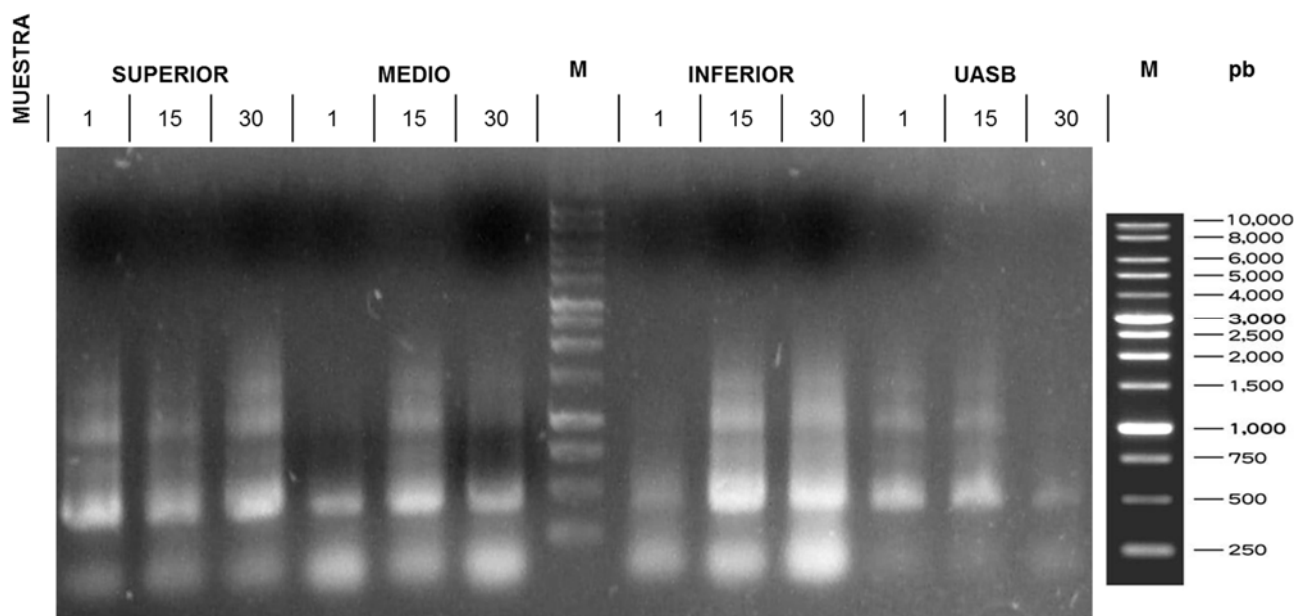


Figura 14. Electroforesis para amplicones de las región V6-V8 del gen *16S rRNA* bacteriano.

M) Marcador de peso molecular *1kb DNA Ladder de Promega* y **pb)** Pares de bases.

3.2.2. Amplificación del *DNA* de arqueas

Se amplificaron mediante *PCR* las regiones V4-V6 del gen *16s rRNA* de arqueas obteniéndose amplicones para las muestras del estrato superior del RHALE de los días 15 y 30, y del lodo anaerobio del *UASB* de los días 1,15 y 30 (Figura 15), confirmando así, que estos puntos había *DNA* de arqueas.

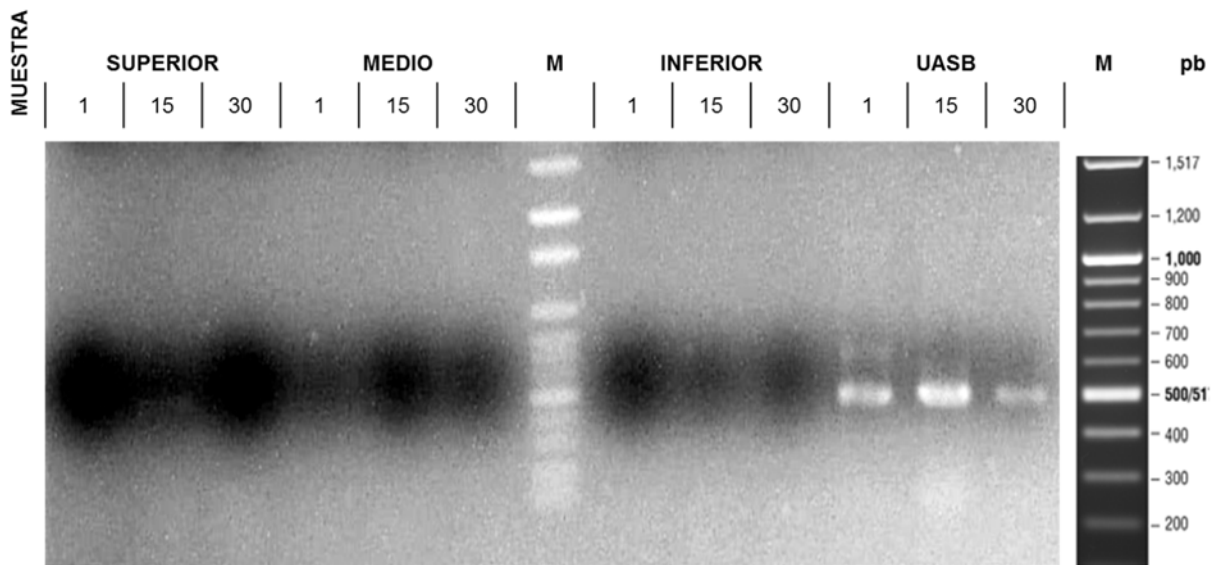


Figura 15. Electroforesis para amplicones de la región V4-V6 del gen 16S *rRNA* de arqueas.
M) marcador de peso molecular *Axygen® DNA LADDER 100BP* y **pb)** Pares de bases.

Al analizar los amplicones de las regiones V4-V6 del gen 16s *rRNA* de arqueas mediante electroforesis en gel de agarosa las bandas de los amplicones fueron: poco visibles para las muestras del estrato superior de los días 15 y 30 del RHALE; no visibles para las demás muestras del RHALE; y muy visibles para las muestras del lodo anaerobio del *UASB* (Figura 15) por lo que se infiere que en la etapa hidrolítica-acidogénica el *DNA* de arqueas es menos abundante que el de bacterias y que el *DNA* de arqueas es más abundante en la segunda etapa de la DA que en la primera.

Debido a que fue posible amplificar satisfactoriamente el *DNA* de bacterias a partir de las mismas muestras se descartó que haya ocurrido la inhibición de la *PCR* por contaminación de los *DNA* extraídos.

3.3. Análisis de la comunidad bacteriana

3.3.1. Esfuerzo de secuenciación

Como resultado de la secuenciación masiva de las regiones V6-V8 del gen *16s rRNA* bacteriano se obtuvieron en total 550,087 secuencias (resultado del alineamiento y ensamble de las secuencias *forward* y *reverse*), las cuáles después de un proceso de análisis de calidad y selección^o (Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur) se redujeron a 298,291 secuencias cuya longitud promedio fue 438 pb.

Las secuencias fueron clasificadas de acuerdo con su similitud con las secuencias del gen *16s rRNA* de la base de datos SILVA en 478 UTO a nivel taxonómico de género, distribuidas en 21 *Phyla*, 47 Clases, 87 Órdenes y 188 Familias.

En las curvas de rarefacción obtenidas mediante el análisis con el software bioinformático Mothur, se observó un comportamiento con tendencia asintótica en el que las pendientes tienden a cero a medida que el número de secuencias aumenta, haciendo que la probabilidad de encontrar nuevas UTO sea menor (

Figura 16).

Con los datos para graficar las curvas de rarefacción se realizó un análisis de regresión no lineal basada en la función de UTO caracterizadas (Ecuación 1)

^o Se eliminaron las secuencias quiméricas, las que tuvieron bases ambiguas, las que tuvieran secuencias homopoliméricas mayores a 8 bases y aquellas cuya longitud no se encontraba entre 435 y 445 bases.

obteniendo valores de R^2 entre 0.95 y 0.98 y valores de significancia para las ecuaciones de $\alpha < 0.01$ para todas las muestras.

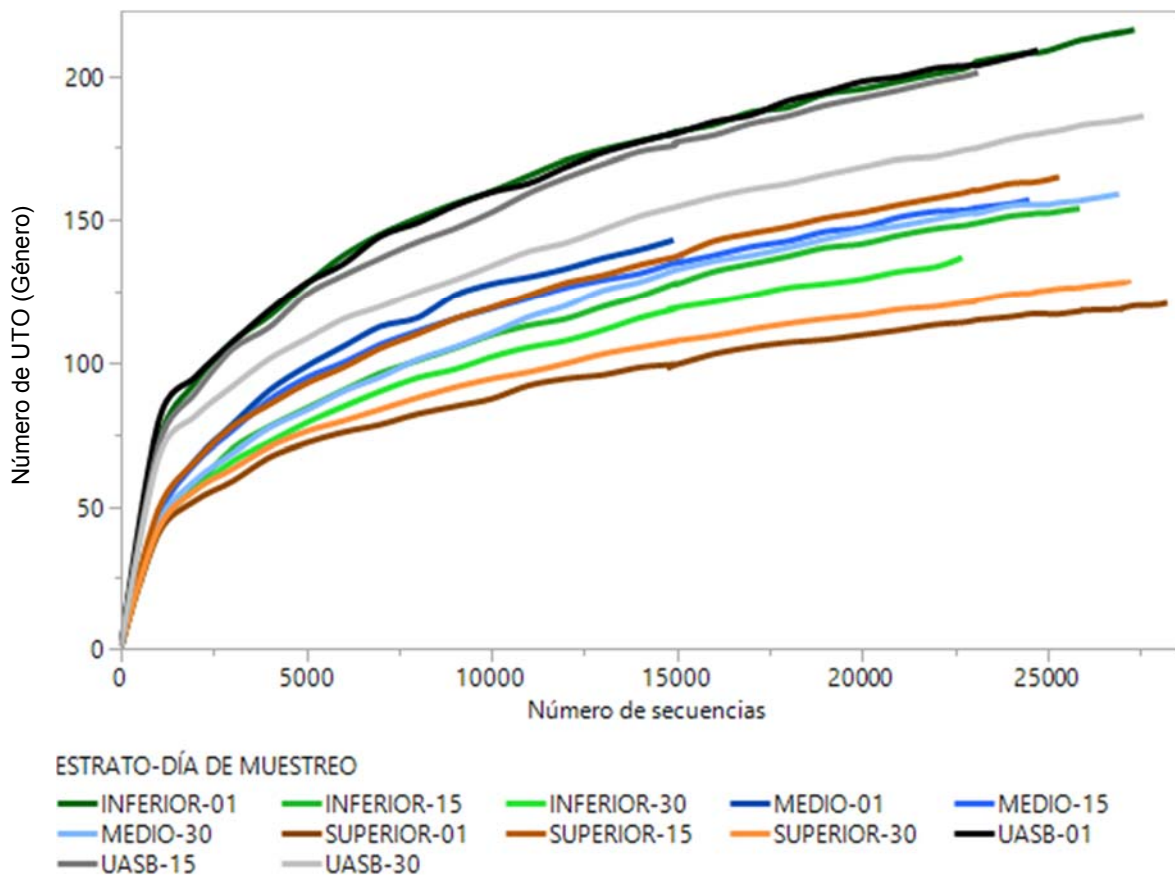


Figura 16. Curvas de rarefacción para las comunidades bacterianas.

El porcentaje de cobertura promedio es de 87% y los valores se encuentran entre un rango de 81-92%. Estos valores son mayores a los del rango 52-85% reportados por Talbot *et al.* 2008, y menores al 97-100% obtenido en otras investigaciones sobre la microbiota en la DA (Jang *et al.* 2014; Pampillón *et al.* 2017; Meng *et al.* 2017).

Sin embargo, la magnitud promedio de las pendientes es de 0.001 y se encuentran entre un rango de 0.0006 al 0.0017 (Tabla 6); si las pendientes de las curvas se encuentra a milésimas de cero y siguen decreciendo (

Figura 16), se infiere que se necesitan miles de secuencias más para que se detecte una nueva UTO, la cual tendrá una proporción tan cercana a cero que prácticamente no afectará la abundancia relativa de las demás UTO.

Tabla 6. Esfuerzo de secuenciación para las comunidades bacterianas.

Muestra	Número de secuencias (nseqs)	Número de UTO caracterizadas (nUTO)	Parámetros		R ²	Pendiente en número de secuencias	Riqueza total de UTO (calculada)	Porcentaje de cobertura
			A	B				
INFERIOR01	27,348	216	0.06	0.0002	0.96	0.001	243	89%
INFERIOR15	25,869	154	0.03	0.0002	0.95	0.001	190	81%
INFERIOR30	22702	137	0.03	0.0002	0.95	0.001	153	89%
MEDIO01	14,911	143	0.05	0.0003	0.98	0.002	171	83%
MEDIO15	24,513	157	0.04	0.0002	0.97	0.001	176	89%
MEDIO30	26929	159	0.03	0.0002	0.97	0.001	196	81%
SUPERIOR01	28233	121	0.03	0.0002	0.95	0.001	135	90%
SUPERIOR15	25,317	165	0.04	0.0002	0.96	0.001	199	83%
SUPERIOR30	27,009	128	0.03	0.0002	0.96	0.001	146	88%
UASB01	24,734	209	0.06	0.0003	0.96	0.001	227	92%
UASB15	23,130	201	0.06	0.0003	0.96	0.001	229	88%
UASB30	27596	186	0.05	0.0002	0.95	0.001	207	90%

Por lo anterior, el esfuerzo de secuenciación permitió detectar a las UTO dominantes y su abundancia relativa de secuencias (ARS) en las muestras, y puede considerarse suficiente para los análisis de composición y estructura de la comunidad bacteriana (Jang *et al.* 2014).

3.3.2. Estimadores de biodiversidad

Riqueza

Con la finalidad de conocer la riqueza de cada comunidad bacteriana utilizando un método distinto al modelo de UTO caracterizadas, se estimó el número de géneros bacterianos en cada muestra, con el estimador Chao (Tabla 7).

Con base en un ANOVA y pruebas de Tukey-Kramer, se reporta con un $\alpha < 0.05$ que no hay diferencias significativas entre las riquezas de las comunidades bacterianas del UASB y del RHALE (Tabla 7).

Tabla 7. Estimadores de biodiversidad para las comunidades bacterianas^d

Muestra	Número de secuencias ^e	Chao (Riqueza)	Shannon-Wiener (Equidad)	Simpson (Dominancia)
INFERIOR01	14,911	246	2.3	0.25
INFERIOR15	14,911	183	1.9	0.28
INFERIOR30	14,911	180	1.7	0.35
MEDIO01	14,911	173	2.1	0.21
MEDIO15	14,911	185	1.6	0.45
MEDIO30	14,911	185	1.7	0.33
SUPERIOR01	14,911	137	1.5	0.42
SUPERIOR15	14,911	207	1.8	0.40
SUPERIOR30	14,911	151	1.4	0.53
UASB01	14,911	244	3.2	0.10
UASB15	14,911	237	3.0	0.11
UASB30	14,911	219	2.7	0.19

^d El análisis estadístico de esta sección pueden ser consultado en el [material suplementario](#).

^e Para calcular los estimadores de biodiversidad con el software Mothur, se normalizó a 14,911 secuencias por muestra, este número corresponde al máximo alcanzado por el esfuerzo de secuenciación para la muestra con menor número de secuencias, que en este caso fue MEDIO01.

Equidad

Con la finalidad de conocer la equidad o uniformidad de las comunidades bacterianas, se calculó el índice de Shannon-Wiener. Este adquiere valores de cero cuando hay una sola especie y el $\log(nOTUs)$ cuando todas las UTO están representadas por el mismo número de individuos.

Con base en un ANOVA y pruebas de Tukey-Kramer, se reporta con un $\alpha < 0.05$ que la equidad de las comunidades bacterianas del *UASB* es mayor que en las del *RHALE* y que no hay diferencias significativas de esta variable entre los diferentes estratos del *RHALE* (Tabla 7). Por lo que las proporciones en las que se encuentran los géneros bacterianos son menos equitativas en la etapa hidrolítica-acidogénica que en la acetogénica-metanogénica.

Los valores del índice de Shannon-Wiener para las muestras del *RHALE* son menores al valor de 2.55 reportado durante la primer etapa de la DA en condiciones termofílicas en reactores escala industrial con un volumen de operación de 105 m³ (Maus *et al.* 2016). Estos autores nos dicen que el valor obtenido por ellos es menor a los comúnmente reportados para sistemas de DA, por ejemplo, se han reportado valores alrededor de 6.8 para reactores escala laboratorio operados a 39°C (Dennehy *et al.* 2017); por lo anterior, se considera probable que la equidad en las comunidades microbianas sea menor en la primer etapa de la DA de la *FORSU* que en sistemas de DA de una sola etapa.

Dominancia

Calculada con el índice de Simpson, manifiesta la probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar de una librería genética pertenezcan a la misma UTO.

Con base en un ANOVA y pruebas de Tukey-Kramer, se reporta con un $\alpha < 0.1$ que la dominancia es mayor en las comunidades bacterianas del RHALE que en las del *UASB* y que no hay diferencia significativa para esta variable entre las comunidades bacterianas de los diferentes estratos del RHALE (Tabla 7), por lo que en las comunidades bacterianas de la etapa hidrolítica-acidogénica hay mayor dominancia que la etapa acetogénica-metanogénica.

3.3.3. Similitudes entre comunidades bacterianas

Con la finalidad de conocer cuánto se asemejan entre sí las comunidades bacterianas con respecto a su composición y estructura, se realizó un análisis multivariable en el que las proporciones en que se encuentran las UTO fueron las variables dependientes y las muestras (punto de muestreo, día de muestreo) las variables independientes.

Se realizó un análisis de componentes principales (*PCA*) basado en covarianzas con el software estadístico JMP para visualizar el agrupamiento de las comunidades bacterianas en un plano bidimensional con base en su similitud en composición y estructura.

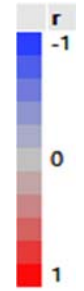
Cabe destacar que en la revisión bibliográfica no se encontró algún estudio de correlaciones multivariable en otros análisis de comunidades microbianas con *NGS*.

Comunidades bacterianas de la etapa hidrolítica-acidogénica

Las comunidades bacterianas del RHALE se asemejan en composición y estructura existiendo correlaciones entre 0.66 y 0.98 con un *p-value* de $\alpha < 0.01$ (Tabla 8), por otra parte, al visualizar la distribución de éstas en un *PCA* se observó un agrupamiento con respecto a la posición de muestreo y no al día de muestreo (Figura 17); es decir, que la posición de muestreo (y no el tiempo) es la variable que más afecta a la similitud-diferencia entre las comunidades bacterianas.

Tabla 8. Correlaciones (arriba) y probabilidad de correlaciones (abajo) entre comunidades bacterianas.

	INFERIOR01	INFERIOR15	INFERIOR30	MEDIO01	MEDIO15	MEDIO30	SUPERIOR01	SUPERIOR15	SUPERIOR30	UASB01	UASB15	UASB30
INFERIOR01	1.0000	0.9679	0.9880	0.7098	0.9138	0.9806	0.8801	0.9411	0.9242	0.0151	0.0041	-0.0017
INFERIOR15	0.9679	1.0000	0.9607	0.6674	0.8337	0.9622	0.8070	0.8536	0.8270	0.0245	0.0009	-0.0031
INFERIOR30	0.9880	0.9607	1.0000	0.7507	0.9502	0.9980	0.9292	0.9565	0.9423	-0.0003	-0.0030	-0.0044
MEDIO01	0.7098	0.6674	0.7507	1.0000	0.7832	0.7588	0.8101	0.7547	0.7616	-0.0044	-0.0073	-0.0076
MEDIO15	0.9138	0.8337	0.9502	0.7832	1.0000	0.9462	0.9902	0.9836	0.9847	-0.0035	-0.0039	-0.0042
MEDIO30	0.9806	0.9622	0.9980	0.7588	0.9462	1.0000	0.9321	0.9447	0.9294	-0.0022	-0.0041	-0.0053
SUPERIOR01	0.8801	0.8070	0.9292	0.8101	0.9902	0.9321	1.0000	0.9598	0.9633	-0.0051	-0.0058	-0.0053
SUPERIOR15	0.9411	0.8536	0.9565	0.7547	0.9836	0.9447	0.9598	1.0000	0.9933	0.0043	-0.0011	-0.0030
SUPERIOR30	0.9242	0.8270	0.9423	0.7616	0.9847	0.9294	0.9633	0.9933	1.0000	-0.0010	-0.0034	-0.0040
UASB01	0.0151	0.0245	-0.0003	-0.0044	-0.0035	-0.0022	-0.0051	0.0043	-0.0010	1.0000	0.7693	0.4582
UASB15	0.0041	0.0009	-0.0030	-0.0073	-0.0039	-0.0041	-0.0058	-0.0011	-0.0034	0.7693	1.0000	0.4565
UASB30	-0.0017	-0.0031	-0.0044	-0.0076	-0.0042	-0.0053	-0.0053	-0.0030	-0.0040	0.4582	0.4565	1.0000
INFERIOR01	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.7425	0.9280	0.9711
INFERIOR15	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.5931	0.9841	0.9459
INFERIOR30	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9946	0.9483	0.9244
MEDIO01	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9240	0.8731	0.8675
MEDIO15	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9395	0.9325	0.9269
MEDIO30	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9615	0.9293	0.9076
SUPERIOR01	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9108	0.8993	0.9086
SUPERIOR15	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9258	0.9801	0.9474
SUPERIOR30	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9823	0.9414	0.9299
UASB01	0.7425	0.5931	0.9946	0.9240	0.9395	0.9615	0.9108	0.9258	0.9823	<.0001	<.0001	<.0001
UASB15	0.9280	0.9841	0.9483	0.8731	0.9325	0.9293	0.8993	0.9801	0.9414	<.0001	<.0001	<.0001
UASB30	0.9711	0.9459	0.9244	0.8675	0.9269	0.9076	0.9086	0.9474	0.9299	<.0001	<.0001	<.0001



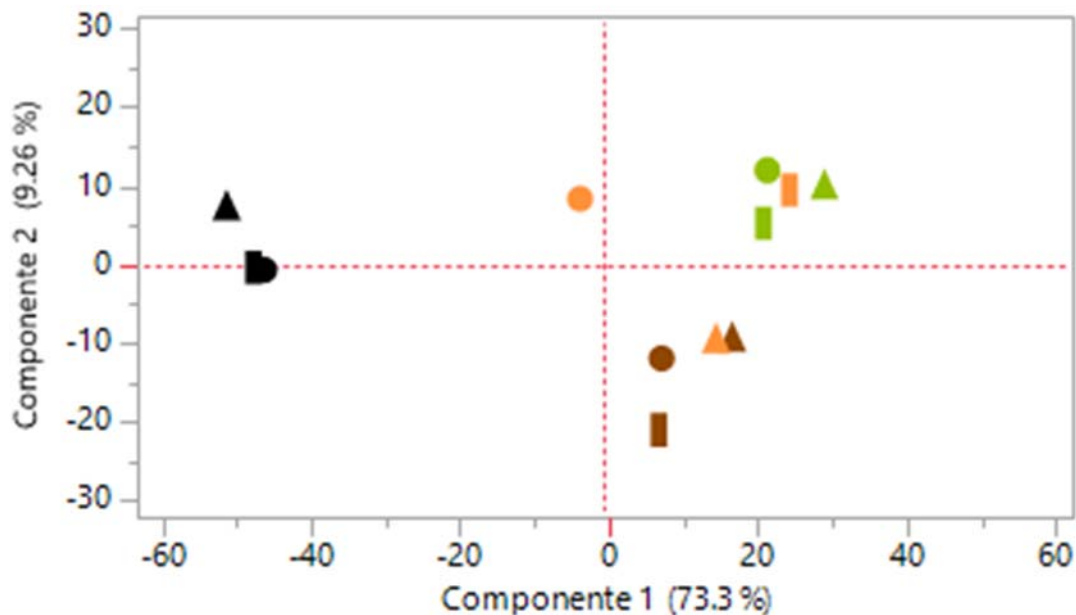


Figura 17. Análisis de componentes principales (PCA) para las comunidades bacterianas.

Las comunidades bacterianas están representadas de acuerdo a la posición de muestreo con los siguientes colores: **Negro**) Lodo anaerobio del UASB, **Café**) Estrato inferior, **Anaranjado**) Estrato medio y **Verde**) Estrato superior. Las comunidades bacterianas están representadas de acuerdo a el día de muestreo con las siguientes figuras: ●) Día 1, ■) Día 15 y ▲) Día 30. Los componentes principales 1 y 2 explican en un 73.3 y 9.26% la variación en la composición y estructura de las comunidades microbianas.

Comunidades bacterianas de la etapa acetogénica-metanogénica.

Se obtuvieron correlaciones positivas entre las comunidades bacterianas del UASB con un *p-value* de $\alpha < 0.01$ (Tabla 8), por otra parte, al visualizar la distribución de éstas en un PCA se observó su agrupamiento (Figura 17); por lo tanto, las comunidades bacterianas del UASB son similares en composición y estructura (ver valores relativos en la Tabla 8).

Comunidades bacterianas en las dos etapas de la DA

Las comunidades bacterianas de ambos reactores, y por ende, de las dos etapas, difieren en composición y estructura. Se obtuvieron correlaciones cercanas a cero entre las comunidades bacterianas del RHALE y del UASB (Tabla 8), así mismo, al visualizar la distribución de éstas en un PCA se observó que las comunidades del UASB son segregadas de las del RHALE (Figura 17). Estos resultados son similares a los de otros autores que también han reportado que las comunidades bacterianas son diferentes para cada etapa de la DA2E (Shin *et al.* 2010; Gaby, Zamanzadeh, and Horn 2017).

Comunidades bacterianas de los diferentes días de muestreo

No se detectó un patrón de agrupamiento de las comunidades bacterianas con respecto al día de muestreo (Figura 17); por lo que si el tiempo impone las condiciones que definen la composición y estructura de las comunidades bacterianas, lo hace en menor grado que la posición de muestreo^f.

^fPara corroborar si existió un efecto significativo de la posición y el tiempo sobre la abundancia relativa de las UTO dominantes en las comunidades bacterianas; se realizó un AMOVA, cuyos resultados se reportan y discuten en la sección “Efecto de la altura y el tiempo sobre la abundancia de las UTO bacterianas más representativas del RHALE”

3.3.4. Composición y estructura de las comunidades bacterianas

Considerando que las comunidades bacterianas del RHALE son similares entre sí y distintas a las del *UASB* y con el objetivo de visualizar las proporciones en que se encuentran los *Phyla*, Clases, Órdenes, Familias y Géneros bacterianos más abundantes del RHALE y del *UASB*, se graficó la abundancia relativa de secuencias (ARS) de las UTO a diferentes niveles taxonómicos (Figura 18 y Figura 19).

Phyla bacterianos

Los *Phyla* bacterianos cuyas ARS son mayores en el RHALE son Bacteroidetes (60%), Firmicutes (35%), Proteobacteria (3%) y Actinobacteria (1%) (Figura 18). Asimismo, los *Phyla* bacterianos cuyas ARS son mayores en el *UASB* son Proteobacteria (46%) Bacteroidetes (32%), Firmicutes (16%) y Actinobacteria (3%) (Figura 19).

Estos *Phyla* han sido reportados como los más abundantes en otros sistemas de DA para el tratamiento de FORSU, con diferentes condiciones de operación y con ARS distintas a las aquí reportadas (Shin *et al.* 2010; Jang *et al.* 2014; Alcántara *et al.* 2017; Pampillón *et al.* 2017; Kirkegaard *et al.* 2017). Dicho lo anterior, las estructuras de las comunidades bacterianas a nivel taxonómico de *Phyla* en el RHALE y el *UASB* son distintas debido a que las condiciones de operación de ambos reactores también son distintas.

Clases bacterianas⁹

Las clases cuyas ARS son mayores en el RHALE son Bacteroidia (59%), Negativicutes (18%), Bacilli (13%), Clostridia (3%) y Alphaproteobacteria (1%), Gammaproteobacteria (1%) Actinobacteria (1%) (Figura 18). Así mismo, las clases cuyas ARS son mayores en el UASB son Gammaproteobacteria (23%), Bacteroidetes NC^h (22%), Clostridia (16%) Deltaproteobacteria (12%) Betaproteobacteria (9%), Bacteroidia (5%), Flavobacteria (4%), Actinobacteria (3%) y Sphingobacteria (1%) (Figura 19).

Órdenes bacterianos

Los órdenes cuyas ARS son mayores en el RHALE son Bacteroidales (59%), Selenomonadales (18%), Lactobacilliales (13%), Clostridiales (3%) Rhodospirillales (1%) Coriobacteriales (0.9) y Pseudomonadales (0.7%) Coriobacteriales (9%) (Figura 18). Así mismo, los órdenes cuyas ARS son mayores en el UASB son Bacteroidetes NC (22%), Pseudomonadales (20%), Clostridiales (16%), Burkholderiales (7%), Bacteroidales (5%) Flavobacteriales (4%) Syntrophobacterales (4%), Desulfovibrionales (3%) Actinomycetales (2%), Desulfobacterales (2%), Rodocyclales

⁹ A partir de aquí, se continuaran describiendo la composición y la estructura de las comunidades microbianas a niveles taxonómicos de Clase, Orden, Familia y Género, y se retomará la discusión en la sección (Géneros bacterianos).

^h Presentadas como NC en la gráfica, son UTO en las que no fue posible asignarles una identidad al nivel taxonómico en cuestión. Esto se debe a que la base de datos SILVA no contó con ninguna secuencia que tenga un valor de similitud mayor o igual a 80%.

(2%) Aeromonadales (1%), Gammaproteobacteria NC (1%) y Sphingobacteriales (1%) (Figura 19).

Familias bacterianas

Las familias cuyas ARS son mayores en el RHALE son Prevotellaceae (56%), Veillonellaceae (18%), Lactobacillaceae (12%), Ruminococcaceae (2%), Bacteroidetes NC (2%), Acetobacteraceae (0.9%) y Acidaminococcaceae (0.9%) Coriobacteriaceae (0.9%) (Figura 18).

Así mismo, las familias cuyas ARS son mayores en el UASB son Bacteroidetes NC (22%), Pseudomonadaceae (19%), Clostridiaceae (8%), Comamonadaceae (6%), Syntrophaceae (4%), Flavobacteriaceae (4%), Desulfomicrobiaceae (3%), Clostridiales NC (3%), Rhodocyclaceae (2%) Moraxellaceae (2%) Porphyromonadaceae (2%), Bacteroidales NC (2%), Propionibacteriaceae (1%), Actinomycetales NC (1%), Desulfobacteraceae (1%), Desulfobulbaceae (1%), Aeromonadaceae (1%) Peptostreptococcaceae (1%) Cytophagaceae (1%) (Figura 19).

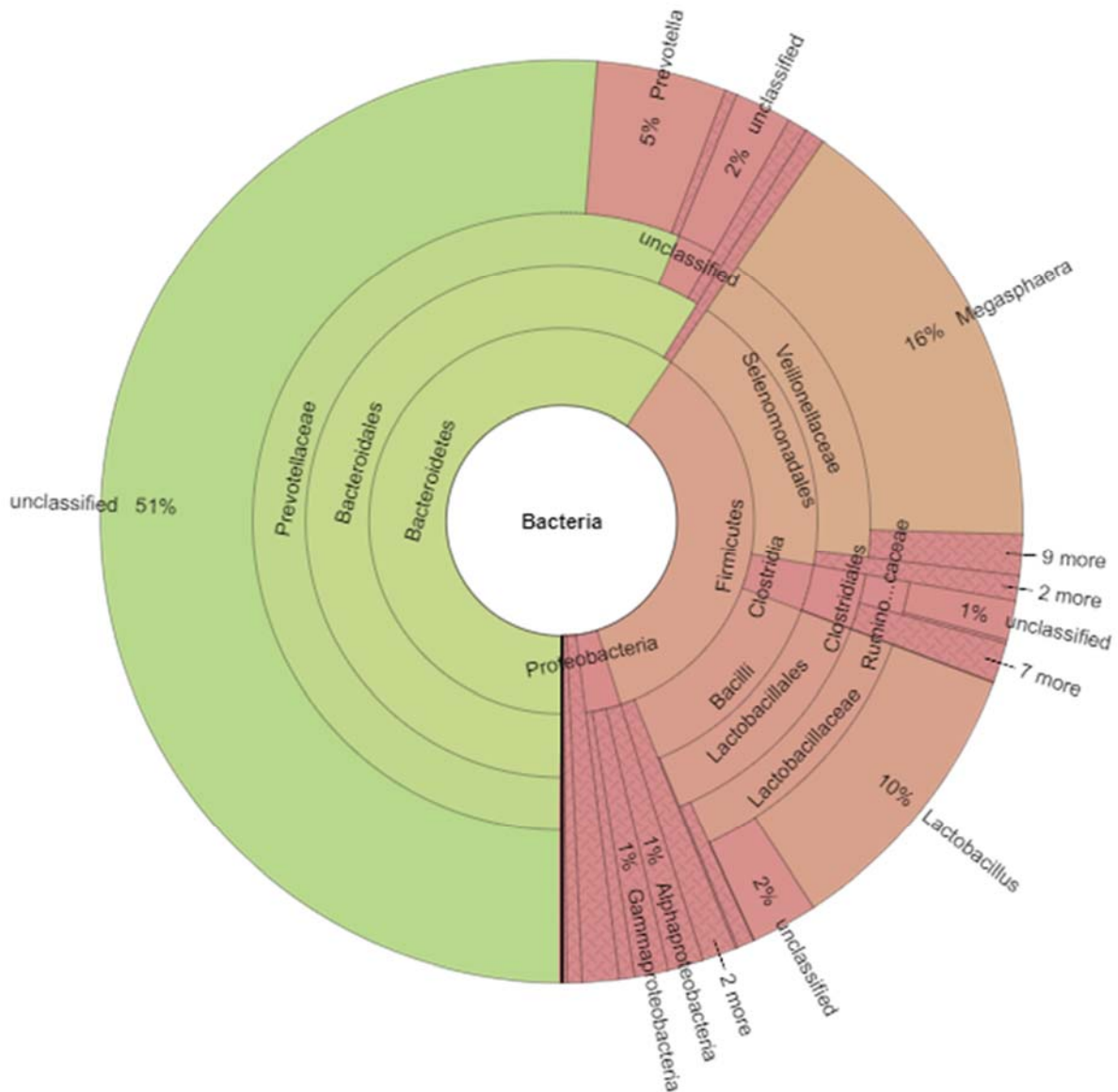


Figura 18. Composición y estructura de la comunidad bacteriana del RHALE.

Se presenta un perfil correspondiente a todas las muestras del RHALE, es decir, a los días 1, 15 y 30 y a los estratos Inferior, medio y superior. Las categorías taxonómicas son representadas del centro a la periferia en el siguiente orden: Dominio, Clase, Orden, Familia y Género. Para visualizar más detalles sobre este gráfico, así como, el perfil de cada muestra consulta el [material suplementario](#).

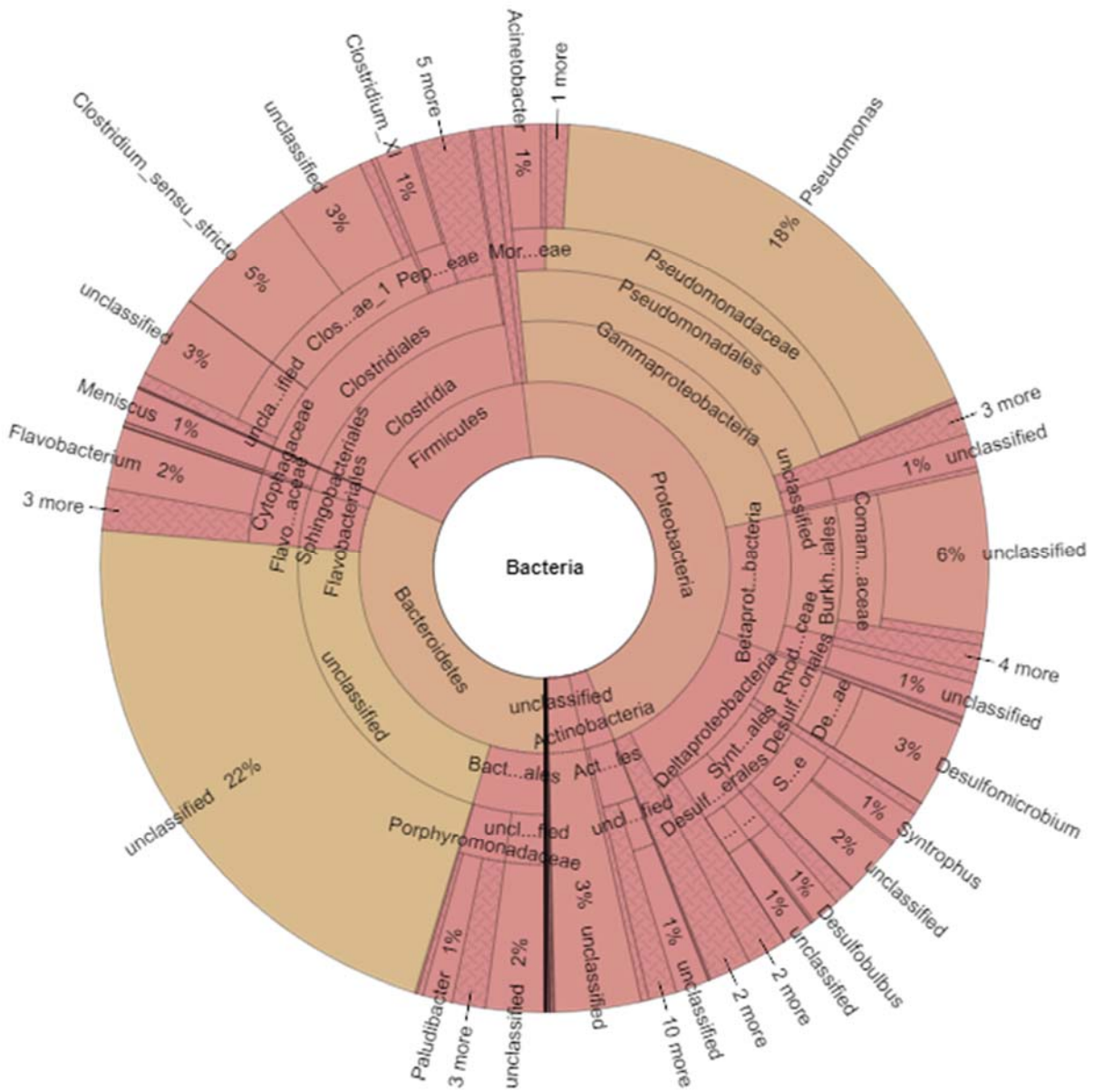


Figura 19. Composición y estructura de la comunidad bacteriana del UASB.

Se presenta un perfil correspondiente a todas las muestras del UASB, es decir, a las de los días 1, 15 y 30. Las categorías taxonómicas son representadas del centro a la periferia en el siguiente orden: Dominio, Clase, Orden, Familia y Género. Para visualizar más detalles sobre este gráfico, así como, el perfil de cada muestra consulta el [material suplementario](#).

Géneros bacterianos

Los géneros cuyas ARS son mayores en el RHALE son Prevotellaceae NC (51%), *Megasphaera* (16%), *Lactobacillus* (10%), *Prevotella* (5%), Lactobacillaceae NC (2%), Bacteroidales NC (2%), Ruminococcaceae NC (1%), *Acetobacter* (0.9%), *Mitsuokella* (0.8%) (Figura 18).

Los géneros cuyas ARS son mayores en el UASB son Bacteroidetes NC (22%), *Pseudomonas* (18%), Comamonadaceae NC (6%), *Clostridium sensu stricto* (5%), Clostridiaceae NC (3%), *Desulfomicrobium* (3%), Bacteria NC (3%), Syntrophaceae NC (2%), *Flavobacterium* (2%), Bacteroidales NC (2%) etc. (Figura 19).

Se observa que las comunidades microbianas son de diferente composición y estructura en ambas etapas de la DA2E; a su vez son diferentes a las reportadas para otros sistemas de tratamiento de FORSU (Shin *et al.* 2010; Li *et al.* 2013; Jang *et al.* 2014; Maus *et al.* 2016; Alcántara *et al.* 2017; Pampillón *et al.* 2017; Kirkegaard *et al.* 2017; Gaby, Zamanzadeh, and Horn 2017; Dennehy *et al.* 2017).

El número de UTO, a nivel taxonómico de género, caracterizadas en el RHALE es 330 y la suma de las ARS de tan sólo las 9 UTO más abundantes del RHALE da un total del 88.7%. Por otro lado, el número de UTO, a nivel taxonómico de género, caracterizadas en el UASB es 312 y la suma de las ARS de tan sólo las 22 UTO más abundantes del RHALE da un total del 78%.

Se observa que, para ambos reactores, un pequeño número de UTO conforma a la mayor parte de la comunidad bacteriana y que la cantidad de UTO que domina la comunidad microbiana en el RHALE es menor que en el *UASB*, esto coincide con la equidad y la dominancia estimadas por los índices de Shannon-Wiener y Simpson respectivamente. Donde la equidad de la comunidad bacteriana es mayor en el *UASB* que en el RHALE y donde la dominancia de la comunidad bacteriana es mayor en el RHALE que en el *UASB*.

3.3.5. Efecto de la altura y el tiempo sobre la abundancia de las UTO bacterianas más representativas del RHALE

Para comprobar que existe un efecto significativo de la posición (altura) y el tiempo sobre la composición de la comunidad bacteriana en el RHALE se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) de un factor con un bloque, donde el factor fue la posición en el RHALE, el bloque fue el tiempo (día de muestreo) y la variable dependiente fue la ARS (%). Se utilizó un nivel de significancia de $\alpha < 0.1$. Sólo se reportan los análisis correspondientes a las UTO bacterianas cuya ARS fue mayor o igual al 1%.

Tabla 9. Efecto de la posición y el tiempo sobre las ARS de las UTO más dominantes en el RHALE

UTO a nivel taxonómico de género.	Factores evaluados		Modo en que afecta a la ARS
	Posición (altura)	Tiempo	
Prevotellaceae NC	No afecta	No afecta	
<i>Megasphaera</i>	Afecta	No afecta	Estrato inferior >Estrato superior
<i>Lactobacillus</i>	No afecta	No afecta	
<i>Prevotella</i>	No afecta	No afecta	
Lactobacillaceae NC	No afecta	No afecta	
Ruminococcaceae NC	No afecta	No afecta	
Bacteroidales NC	No afecta	No afecta	
Erysipelotrichaceae NC	No afecta	No afecta	
<i>Acetobacter</i>	Afecta	No afecta	Estrato inferior >Estrato superior
<i>Mitsuokella</i>	No afecta	No afecta	

Los valores de “p” del AMOVA y las pruebas de Tukey-Kramer pueden consultarse en el [material suplementario](#) .

Mediante el AMOVA se comprobó que las ARS de Prevotellaceae NC, *Lactobacillus*, *Prevotella*, Lactobacillaceae NC, Ruminococcaceae NC, Bacteroidales NC, Erysipelotrichaceae NC y *Mitsuokella* no presentaron cambios significativos con

respecto a la posición en el RHALE, sin embargo sí que existe efecto de la posición en el biodigestor sobre variación en la ARS de *Megasphaera* y *Acetobacter* (Tabla 9, Figura 20).

Posteriormente, mediante pruebas de Tukey-Kramer se comprobó que las ARS de estas dos últimas UTO, son mayores en el estrato inferior que en el estrato superior del RHALE (Tabla 9).

Por otro lado, se comprobó mediante AMOVA que el tiempo no fue un factor que afectó a las ARS de las UTO dominantes del RHALE durante el periodo estudio (Tabla 9).

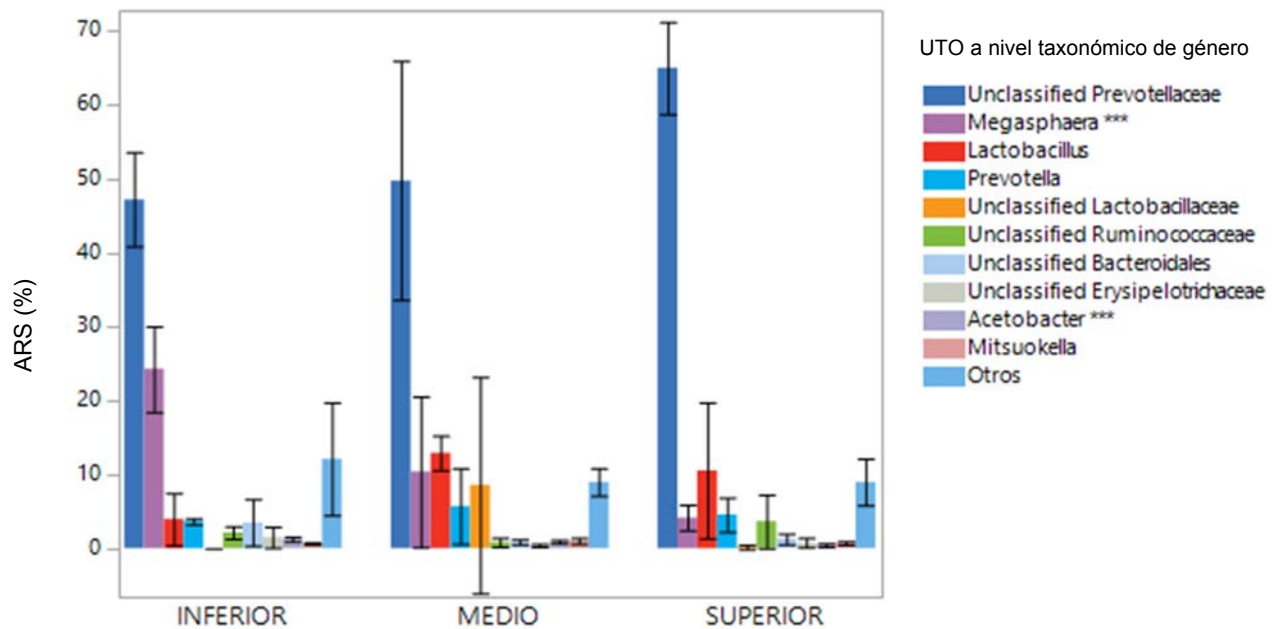


Figura 20. UTO bacterianas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica

*** UTO cuya ARS es afectada por la altura en el RHALE. El grupo "Otros" incluye a 320 UTO con ARS promedio menor a 1%.

3.3.6. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la primera etapa de la DA

Con finalidad de conocer cuáles son los posibles roles metabólico de las UTO bacterianas dominantes en el RHALE, se realizó una revisión bibliográfica; utilizando como fuentes la segunda edición del Manual Bergey's y artículos científicos de caracterización de comunidades microbianas durante la DA. Sólo se reportan las UTO bacterianas cuya ARS fue mayor o igual al 1% (Figura 20, Tabla 10).

Tabla 10. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica

Nivel taxonómico		Posible rol metabólico		ARS (%)
<i>Phyla</i>	Género	Hidrolítico-acidogénico	Acetogénico	
Bacteroidetes	Prevotellaceae NC	X	X	51
	<i>Prevotella</i> **	X	X	5
	Bacteroidales NC	X		2
Firmicutes	<i>Megasphaera</i>	X		16
	<i>Lactobacillus</i>	X	X	10
	Lactobacillaceae NC	X		2
	Ruminococcaceae NC	X		1
	Erysipelotrichaceae NC		X	1
	<i>Mitsuokella</i>		X	1
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i> *			1

NC No clasificado a nivel taxonómico de Género. X Candidato a tener el rol metabólico en cuestión. * UTO con rol metabólico no definido. ** UTO posiblemente patógena.

Prevotellaceae NC

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género, se discute la importancia de la familia Prevotellaceae durante la DA.

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias de la familia Prevotellaceae son anaerobias, no formadoras de esporas, no móviles, Gram-negativas y sacarolíticas.

Se ha reportado que la familia Prevotellaceae es de las más abundantes durante la adaptación de consorcios microbianos en la DA de hojas de maíz bajo condiciones mesofílicas (30 °C) a pH 7.2, y que el aumento de la abundancia relativa de esta familia bacteriana durante la adaptación se relaciona con aumentos en: la actividad hidrolítica, la solubilización de glucosa y DQO y la producción de AGV (Poszytek *et al.* 2017); la familia Prevotellaceae también ha sido reportada como “abundante” durante la DA de residuos de cerdo bajo condiciones termofílicas (55-65 °C) a pH 7.1-7.2 y asociadas con la producción de H₂ (Tzun *et al.* 2017).

Por lo anterior, la dominancia de *Prevotellaceae* NC en la primera etapa de la DA se debió a su capacidad de adaptación a las condiciones de operación en la misma y es muy probable que participe en la hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis de la FORSU.

Megasphaera

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias del género *Megasphaera* son anaerobias, cocos, Gram-negativas, no móviles y no formadoras de endosporas, pueden metabolizar piruvato y algunos de sus productos finales más comunes son los ácidos acético, propiónico, butírico y valérico.

El género *Megasphaera* ha sido caracterizado dentro de los más abundantes durante la primer etapa de la DA de aguas residuales ricas en sulfato a pH de 6.3 (Shan *et al.* 2017) así como, durante la digestión anaerobia de lodo anaerobio de purga a 35 °C a pH de 6.2, en la que los lodos fueron pretratados con biosurfactante (Zhou *et al.* 2015); en ambos casos, *Megasphaera* fue asociado con la hidrólisis y acidogénesis y sólo en el primer caso con la reducción de sulfato.

Debido a lo anterior, se enuncia lo siguiente en referencia a la UTO *Megasphaera*: que es posible su participación durante la hidrólisis y acidogénesis de la FORSU; que su abundancia, la cual es mayor en el estrato inferior que en el superior, se debe posiblemente a un gradiente de concentración de sulfato en el que éste podría encontrarse en mayor concentración en el fondo del RHALE debido a la solubilización de compuestos orgánicos arrastrados en el lixiviado; y que es posible una reducción de sulfato en el RHALE y, por lo tanto, la producción de H₂S. Debido a lo último, se recomienda un monitoreo de H₂S para conocer más sobre la producción del mismo.

Lactobacillus

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias del género *Lactobacillus* son anaerobias facultativas, de formas variables, Gram-positivas, su motilidad no es común y no forman esporas. Son fermentadoras sacaroclásticas obligadas, cuyo producto carbonado final es lactato, otros productos adicionales pueden ser acetato, etanol, CO₂, formiato y succinato.

Lactobacillus ha sido reportado entre los más abundantes durante la primer etapa de la DA de FORSU bajo condiciones termofílicas (55 °C) a pH 5.3 ± 0.2 (Giuliano *et al.* 2014), así como, bajo condiciones mesofílicas (35 ± 1 °C) a pH 7 ± 0.1 , en ambos casos este género ha sido relacionado con actividad hidrolítica, acidogénica (produciendo de lactato principalmente), y sólo en el primer caso los autores hacen hincapié en la importancia de este género durante la producción de H₂.

Con base en las investigaciones citadas, es posible que *Lactobacillus* participe durante la hidrólisis, acidogénesis (produciendo principalmente lactato), y acetogénesis y debido a lo anterior se recomienda monitorear la producción de lactato y de H₂ con la finalidad de conocer si estos se producen o no.

Prevotella

En el Manual Bergey's se reporta a las integrantes del genero *Prevotella* como no formadoras de esporas, Gram-negativas, anaerobias, sacarolíticas moderadas, y productoras de ácido succínico y acético como metabolitos finales.

El género *Prevotella* ha sido reportado entre los más abundantes durante la primer etapa de la DA de FORSU bajo condiciones mesofílicas a pH de 7.43 ± 0.11 (Min *et al.* 2015) Así como durante la DA en estado sólido de una etapa bajo condiciones mesofílicas a (35 °C) a pH 7 (Li *et al.* 2013); debido a lo anterior es posible la participación de la UTO *Prevotella* en la hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis de la FORSU.

Lactobacillaceae NC

No fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género por lo que se discute la importancia de la familia Lactobacillaceae durante la DA.

Según el Manual Bergey's las bacterias de la familia Lactobacillaceae son no formadoras de esporas, Gram-positivas, anaerobias de metabolismo fermentativo, sacaroclásticas obligadas, y son principalmente productoras lactato y adicionalmente de acetato, etanol, formiato, CO₂ o succinato.

Se ha reportado que la familia Lactobacillaceae es de las más abundantes durante la primer etapa de la DA de FORSU bajo condiciones termofílicas (55 °C) a pH 5.3±0.2 (Giuliano *et al.* 2014) así como, durante la adaptación de consorcios microbianos en la DA de hojas de maíz bajo condiciones mesofílicas (30 °C) a pH 7.2 (Poszytek *et al.* 2017), por lo anterior, es posible la participación de *Lactobacillaceae NC* durante la hidrólisis y acidogénesis de la FORSU, produciendo principalmente lactato.

Ruminococcaceae NC

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias de la familia Ruminococcaceae son morfológicamente diversas y todas son anaerobias obligadas. No se describe más sobre las características de esta familia.

Bacterias de la familia Ruminococcaceae han sido caracterizadas durante la DA en una etapa, por ejemplo; durante la DA de FORSU bajo condiciones mesofílicas (35°C) a pH ~7.5 (Alcántara *et al.* 2017), durante la DA de residuos de cerdo bajo

condiciones termofílicas (55-65 °C) a pH 7.1-7.2 (Tzun *et al.* 2017), durante la DA de residuos de cerdo y FORSU a 39°C y pH ~7.5 (Dennehy *et al.* 2017); en todos los casos la presencia de esta familia bacteriana es relacionada con la hidrólisis y producción de AGV y sólo en el segundo caso es asociada con la producción de H₂.

Debido a lo anterior, es posible la participación de *Ruminococcaceae* NC en los procesos metabólicos de hidrólisis y acidogénesis de la FORSU en el RHALE, así como en la producción de H₂.

***Bacteroidales* NC**

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género, se discute la importancia de orden Bacteroidales durante la DA.

En el Manual Bergey's las bacterias del orden Bacteroidales son Gram-negativas, no formadoras de esporas, la mayoría anaerobias, sacarolíticas, algunas pueden utilizar proteínas como sustrato, no móviles.

El orden bacteriano Bacteroidales ha sido caracterizado durante la digestión anaerobia en una etapa de: FORSU a 35±1 °C a pH ~7 (Bi *et al.* 2016); de residuos de residuos de cerdo a 35 °C a pH de 7.5±0.35 (Pampillón *et al.* 2017), y de biomasa microalgal a 35±2 °C a pH 6-7 (Doloman *et al.* 2017), en todos los casos este orden bacteriano está relacionado con las actividades metabólicas hidrolítica y acidogénica.

Debido a lo anterior, es posible que *Bacteroidales* NC participe durante la hidrólisis y acidogénesis de la FORSU en el RHALE.

Erysipelotrichaceae NC

Se discute la importancia de la familia Erysipelotrichaceae durante la DA, ya que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género

En el Manual Bergey's se reporta que los integrantes de la familia Erysipelotrichaceae son no mótils, no productoras endosporas, aerobias o anaerobias facultativas, quimiorganótrofas, de metabolismo respiratorio y poco fermentativo en el que producen ácidos pero no gases a partir de glucosa y otros carbohidratos.

Bacterias de la familia Erysipelotrichaceae han sido reportadas como “abundantes” durante la DA de residuos de cerdo bajo condiciones mesofílicas (37 °C) y termofílicas (55 °C) a pH 7.1-7.2 y asociadas con la producción de acetato (Tzun *et al.* 2017); también han estado presentes durante la DA de residuos de cerdo y FORSU a 39°C y pH ~7.5 (Dennehy *et al.* 2017), en este último no se reporta el posible rol metabólico de esta familia.

En consecuencia, es posible que Erysipelotrichacea NC participe en la fermentación acetogénica de la FORSU en el RHALE.

Acetobacter

Según el Manual Bergey's las bacterias del género Acetobacter pueden ser mótils o no mótils, no producen endosporas, son Gram-negativas, aerobias obligadas, no

fermentativas, pueden oxidar etanol o ácido acético a CO_2 y H_2O , su temperatura óptima es 30°C y su pH óptimo es de 4.0 – 6.0.

Éste género ha sido reportado durante la DA de hojas de maíz bajo condiciones mesofílicas (30°C) a pH 7.2 y su presencia se ha relacionado a la producción de acetato (Poszytek *et al.* 2017). Son muy escasas las referencias que existen sobre este género microbiano durante la DA y las características del mismo en el Manual Bergey's (reportado como un género de bacterias aerobias obligadas) no coinciden con las condiciones de anaerobiosis en el RHALE.

Por lo anterior, se enuncia lo siguiente con respecto a UTO *Acetobacter*: se considera como desconocido su rol metabólico en la primera etapa de la DA, es posible que ésta se encuentre en mayor abundancia en el estrato inferior del RHALE debido a su afinidad por el acetato (considerando la existencia de un gradiente de acetato en el RHALE en el que la concentración es mayor en el estrato inferior que en el superior); y por último, es posible la existencia de una variante anaerobia de este género microbiano.

Mitsuokella

En Manual Bergey's se reportan a las bacterias del género *Mitsuokella* como Gram-negativas, anaerobias obligadas, no formadoras de endosporas, de metabolismo fermentativo produciendo acetato, lactato y succinato.

No se encontró bibliografía en la que se reporte la presencia de *Mitsuokella* durante la DA, sin embargo debido a las características de este género según el Manual Bergey's, se considera posible la participación de esta UTO durante la acidogénesis en el RHALE.

3.3.7. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la segunda etapa de la DAⁱ.

Con la finalidad de conocer cuáles son los posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas en el UASB se realizó una revisión bibliográfica. Se reportan resultados para las UTO bacterianas cuya ARS fue mayor a 1% (Figura 21, Tabla 11).

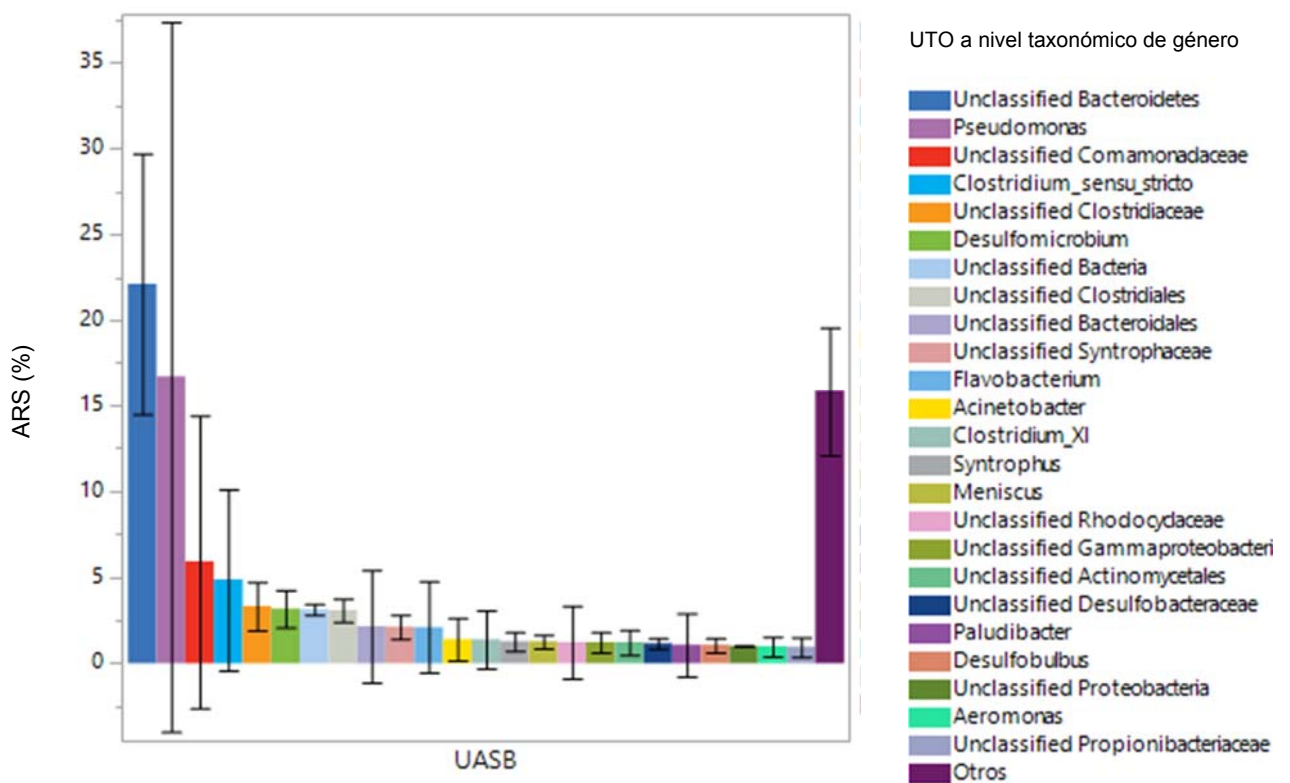


Figura 21. UTO bacterianas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica
El grupo “Otros” incluye a 198 UTO con ARS promedio menor a 1%.

ⁱ En este punto es importante recordar que en este reactor no sólo se lleva a cabo la segunda etapa de la DA de la FORSU, sino también el tratamiento anaerobio de aguas residuales de la UAM-I.

Tabla 11. Posibles roles metabólicos de las UTO bacterianas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica.

Nivel taxonómico		Posible rol metabólico			ARS (%)
<i>Phyla</i>	Género	Hidrolítico-acidogénico	Acetogénico	Otros	
Bacteroidetes	Bacteroidetes NC	X	X		22
	Bacteroidales NC	X			2
	<i>Flavobacterium</i>	X		RS	2
	<i>Meniscus</i>	X			1
	Paludibacter	X	X	RS	1
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	X	X		17
	Comamonadaceae NC			DN y RP	6
	<i>Desulfomicrobium</i>			RP y CM	3
	Syntrophaceae NC		X	RS	2
	<i>Acinetobacter</i>		X	CM	1
	<i>Syntrophus</i>				1
	Rhodocyclaceae NC		X	DN y RS	1
	Gammaproteobacteria NC	X		DN, RS y RP	1
	Desulfobacteraceae NC	X	X	RS	1
	<i>Desulfobulbus</i>		X	RS	1
	Proteobacteria NC	X	X	RS	1
	<i>Aeromonas</i> **		X		1
Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto</i> **	X			5
	<i>Clostridium IX</i> **	X			2
	Clostridiaceae NC	X			3
	Clostridiales NC	X			3
Actinobacteria	Actinomycetales NC		X		1
Bacteria NC*					3

NC No clasificado a nivel taxonómico de Género. X Candidato a tener el rol metabólico en cuestión. DN Desnitrificante. RP Reductora de fosfato. RS Reductora de sulfato. RS⁰ Reductora de azufre elemental. CM Competidora de la metanogénesis. *Rol metabólico no definido. ** Posiblemente patógena

Bacteroidetes NC

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género, se discute la importancia del *Phyla* Bacteroidetes durante la DA.

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias del *Phyla* Bacteroidetes son fenotípicamente diversas, por lo que las únicas generalidades que se reportan para este *Phyla* es que son Gram-negativas y no formadoras de esporas.

El *Phyla* Bacteroidetes es de los más caracterizados durante la DA, por ejemplo: durante la DA de aguas residuales a 7, 15 y 35 °C, siendo el *Phyla* más abundante a 7° C durante la producción de metano a partir de acetato por la arquea *Methanosaeta* (Gunnigle *et al.* 2015) ; durante la digestión anaerobia de lodo anaerobio de purga a 35 °C a pH de 6.2, en la que los lodos fueron pretratados con biosurfactante (Zhou *et al.* 2015); también ha sido reportado entre los *Phyla* más abundantes durante un estudio en el que se caracterizaron las comunidades microbianas de 32 reactores escala industrial (Kirkegaard *et al.* 2017).

Se ha sugerido la participación del *Phyla* Bacteroidetes en la fermentación de macromoléculas orgánicas como polisacáridos, proteínas y lípidos (Narihiro *et al.* 2014; Alcántara *et al.* 2017). Debido a lo anterior, es posible la participación de Bacteroidetes NC durante la hidrólisis-acidogénesis y acetogénesis en el *UASB*.

Pseudomonas

Según el Manual Bergey's las bacterias del género *Pseudomonas* son mótils (raramente no mótils), regularmente aerobias, pero pueden participar en la oxidación de nitrato bajo condiciones anaerobias, y quimioorganotróficas con capacidad hidrolítica.

Pseudomonas han sido reportadas presentes durante la DA de lodo anaerobio de purga a 35 °C a pH de 6.2, en la que los lodos fueron pretratados con biosurfactante y relacionadas con la fermentación de glucosa y xilosa para la producción de AGV (Zhou *et al.* 2015), también han sido caracterizadas como el género más abundante

durante la DA de residuos de cerdo a 37 °C y pH 7.0±0.1, cuya presencia fue asociada con la producción de AGV (Rodríguez *et al.* 2014) así mismo, se han encontrado durante la DA de FORSU en estado sólido a 35 °C a pH 7 (Li *et al.* 2013).

Debido a lo anterior, es posible que la UTO *Pseudomonas* participe en la acetogénesis y acidogénesis en el *UASB*, y al mismo tiempo es posible que su presencia indique tolerancia hacia algunos compuestos de azufre o metales (estos últimos no son caracterizados en el reactor).

Comamonadaceae NC

En el Manual Bergey's se describen a las bacterias de la familia Comamonadaceae como: Gram-negativas, móviles, quimioorganotróficas, quimiolitotróficas facultativas (oxidando H₂ y CO), siendo el oxígeno el principal aceptor de electrones. Algunas especies pueden utilizar nitratos.

Esta familia no ha sido caracterizada como abundante en durante la DA, sin embargo ha sido reportada en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales como un grupo de organismos acumuladores de fosfato durante la remoción de fosfato biológico a temperatura de 20-22 °C a pH 7.0-7.8 (Ge *et al.* 2015).

Por lo anterior, es posible que Comamonadaceae NC no participe durante la DA, pero si durante la remoción de fosforo biológico y nitrato en el *UASB*.

Clostridium sensu stricto y Clostridium IX

Las bacterias del género *Clostridium*, según el Manual Bergey's, son Gram-positivas, móviles o no móviles, usualmente quimioorganotróficas, pueden ser sacarolíticas y proteolíticas, pueden metabolizar carbohidratos, alcoholes, aminoácidos, purinas, esteroides u otros compuestos orgánicos. La mayoría de las especies son anaerobias obligadas.

Es posible la participación de las UTO *Clostridium sensu stricto y Clostridium IX* durante la hidrólisis y acidogénesis en el *UASB* debido a que se ha encontrado durante la DA de lodo anaerobio de purga a 35 °C a pH de 6.2, en la que los lodos fueron pretratados con biosurfactante y relacionado con la hidrólisis y acidogénesis (Zhou *et al.* 2015): y también ha sido reportado como un hidrolítico y acidogénico durante la DA de algas (Williams, Withers, and Sutherland 2012).

Es importante mencionar que algunas especies patógenas del género *Clostridium* pueden sobrevivir durante la DA (Fröschle *et al.* 2015; Meng *et al.* 2017) por lo que se recomienda realizar una caracterización a nivel de especie para un mayor control de estos en el *UASB*.

Clostridiaceae NC

Según el Manual Bergey's las bacterias de la familia Clostridiaceae son generalmente anaerobias obligadas, usualmente Gram-positivas, algunas pueden ser

glucolíticas, sacarolíticas, peptolíticas, y quimiolitotróficas, son fermentativas y algunos de sus productos pueden ser ácidos orgánicos o alcoholes.

No fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género y se discute la importancia de la familia *Clostridiaceae* durante la DA, la cual se encontró entre las abundantes durante la adaptación de consorcios microbianos en la DA de hojas de maíz bajo condiciones mesofílicas (30 °C) a pH 7.2 (Poszytek *et al.* 2017), así como, durante la DA de residuos de cerdo a 35 °C a pH de 7.5±0.35 (Pampillón *et al.* 2017) en cuyos casos fue relacionado con una actividad hidrolítica así como con la producción de AGV .

Consecuentemente, es posible la participación de *Clostridiaceae* NC durante la hidrólisis y acidogénesis en el *UASB*.

Desulfomicrobium

En el Manual Bergey's se describe al género *Desulfomicrobium* como Gram-negativas, mótils, no formadoras de esporas, anaerobias utilizando sulfato o sulfoxianiones como aceptores de electrones, produciendo H₂S. Otros donadores de electrones pueden ser el lactato, piruvato, etanol, formiato e hidrógeno. No pueden fermentar carbohidratos. Su temperatura óptima de crecimiento es 25-30 °C.

Desulfomicrobium ha sido reportado en la DA termofílica (54 ± 1 °C) de estiércol como competidor de la metanogénesis debido a su consumo de AGV (Campanaro *et al.* 2016), también ha sido encontrado durante la DA de FORSU en estado sólido a

35°C a pH 7 (Li *et al.* 2013) así como durante la DA de aguas residuales de rastro a 55°C (Jabari *et al.* 2015) en los últimos dos sistemas no se discute la participación de este género. Otros autores reportan la presencia de este género bacteriano durante el tratamiento de aguas residuales contaminadas con alquilbenceno sulfonato linear, y relacionado con la eliminación del mismo (Vieira *et al.* 2017).

Por lo tanto, es posible que la UTO *Desulfomicrobium* compita con las arqueas acetoclásticas de la DA al consumir AGV en el *UASB*, del mismo modo, podría participar en la reducción de sulfatos provenientes de las aguas residuales de la UAM-I y produciendo H₂S.

Bacteria NC

Debido a que el dominio Bacteria es muy diverso se considera desconocido el rol metabólico de la UTO Bacteria NC durante la DA en el *UASB*.

Clostridiales NC

Ya que no fue posible clasificar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia del orden Clostridiales durante la DA.

Este orden es fenotípicamente, quimiotaxonómicamente, fisiológicamente y ecológicamente diverso, por lo que no se reportan características generales en el Manual Bergey's.

El orden Clostridiales ha sido caracterizado entre los más abundantes durante la DA en varios sustratos, por ejemplo: de FORSU a 35 °C (Alcántara *et al.* 2017), durante la DA de celulosa a 55°C a pH 7 (Xia *et al.* 2014) y durante la DA de biomasa microalgal en un *UASB* a 35±2 °C y pH 6-7 (Doloman *et al.* 2017). En todos los casos mencionados la presencia de este orden bacteriano se relaciona con la hidrólisis y la acidogénesis durante la DA.

De esta manera, es posible que la Clostridiales NC participe en la hidrólisis y la acidogénesis durante la DA en el *UASB*.

Bacteroidales NC

Debido a la discusión realizada para esta UTO presente en el RHALE (ver la sección Bacteroidales) es posible que ésta participe en la hidrólisis-acidogénesis en el *UASB*.

Syntrophaceae NC

Se discute la importancia de la familia Syntrophaceae durante la DA en el *UASB* debido a que no fue posible clasificar esta UTO a nivel taxonómico de género. La cual según el Manual Bergey's utiliza al sulfato como aceptor de electrones reduciéndolo a sulfito, cuyo proceso anterior es acoplado a la oxidación incompleta de sustratos orgánicos a acetato.

La familia Syntrophaceae ha sido caracterizada como poco abundante durante la DA de residuos de cerdo bajo condiciones mesofílicas (37 °C) y termofílicas (55 °C) sin que se reporte su rol metabólico (Tzun *et al.* 2017). También ha sido caracterizada

como una familia importante durante la DA de hidrocarburos (alcanos) del petróleo crudo (Gray *et al.* 2011; Ding *et al.* 2015).

Por lo anterior *Syntrophaceae* NC puede participar durante la oxidación de hidrocarburos a acetato y durante la reducción de sulfato, ambos sustratos presentes en las aguas residuales de la UAM-I.

Flavobacterium

Se reporta en el Manual Bergey's las bacterias del género *Flavobacterium* son no formadoras de endosporas, móviles (algunas) y anaerobias (algunas). Pueden oxidar carbohidratos y pueden reducir nitrato a nitrito.

Bacterias del género *Flavobacterium* han sido encontradas durante la DA de aguas residuales para la remoción de fósforo orgánico siendo asociadas a la degradación de proteínas (Keating *et al.* 2016), también se han encontrado en el lodo de purga de un reactor mesofílico anaerobio escala industrial alimentado con 95% v/v de agua residual municipal y 5% v/v de FORSU (Shin *et al.* 2010).

Con base en las investigaciones citadas, es posible la participación de la UTO *Flavobacterium* durante la hidrólisis-acidogénesis así como con la reducción de sulfato en el *UASB*.

Acinetobacter

De acuerdo al Manual Bergey's las bacterias del género *Acinetobacter* son Gram-negativas, no formadoras de esporas, aerobias obligadas. Pueden utilizar acetato o lactato como fuente de carbono y energía, y pueden utilizar amonio y nitrato como fuente de nitrógeno.

El género *Acinetobacter* ha sido caracterizado durante la primer etapa de la DA de aguas residuales ricas en sulfato a pH de 6.3 (Shan *et al.* 2017) así como durante la DA de residuos de cerdo mezclados con aguas residuales bajo temperaturas entre un rango de 35-55 °C (Pampillón *et al.* 2017), debido a la baja abundancia de este género, en ninguno de estos sistemas se discute sobre su posible rol en la DA.

Debido a lo anterior, es posible que la UTO *Acinetobacter* sea competidor la DA al consumir acetato y lactato, también es posible que consuma el amonio y nitrato presentes en el *UASB*.

Algunas especies pertenecientes a este género son consideradas patógenas y persistentes durante la DA en condiciones mesofílicas (Resende *et al.* 2014) por lo que se recomienda hacer una caracterización de esta UTO a nivel taxonómico de especie con la finalidad de verificar que no sea patógena.

Syntrophus

En el Manual Bergey's se describen a las bacterias del género *Syntrophus* como Gram-negativas, no formadoras de endosporas, móviles (algunas), anaerobias y quimioorganotróficas estrictas. Algunos sustratos como el benzoato o ácidos grasos son oxidados a acetato en presencia de H₂ y formiato.

Es posible que *Syntrophus* participe durante la DA de compuestos aromáticos presentes en las aguas residuales de la UAM-I transformándolos en acetato. Debido a que se ha reportado la presencia de este género bacteriano durante el tratamiento de aguas residuales contaminadas con alquilbenceno sulfonato lineal, y relacionadas con la eliminación del mismo (Vieira *et al.* 2017); así mismo, ha sido caracterizada como degradador de (alcanos) del petróleo crudo durante la DA de hidrocarburos (Gray *et al.* 2011).

Meniscus

Las bacterias del género *Meniscus* son Gram-negativas, no motiles, encapsuladas y quimiorganótrofas; tienen metabolismo fermentativo, y viven su temperatura óptima de crecimiento es 30 °C, según el Manual Bergey's.

No se encontraron reportes de este género en la DA, sin embargo, debido a sus características es posible que la UTO *Meniscus* participe durante la hidrólisis-acidogénesis en el *UASB*.

Rhodocyclaceae NC

No fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género y se discute la importancia de la familia Rhodocyclaceae durante la DA; la cuál de acuerdo al Manual Bergey's es fenotípicamente, metabólicamente, y ecológicamente diversa. Incluyendo bacterias fotoheterótrofas; aerobias, anaerobias y anaerobias facultativos; así como organismos fermentativos y organismos fijadores de nitrógeno.

Se ha reportado una UTO de la familia Rhodocyclaceae, no clasificada a los niveles taxonómicos de género y especie, durante la DA de estiércol de ganado bajo condiciones termofílicas (54 ± 1 °C), la cual fue caracterizada con potencial de: oxidación de propionato y butanoato a acetato; desnitrificación, y sulfato reducción (Campanaro *et al.* 2016). .

Por lo anterior, es posible la participación de la UTO Rhodocyclaceae NC durante la acetogénesis en la DA, así como durante la desnitrificación y sulfato reducción en el tratamiento de la aguas residuales de la UAM-I.

Gammaproteobacteria NC

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia de la clase Gammaproteobacteria durante la DA.

En el Manual Bergey's no se reportan generalidades sobre la clase Gammaproteobacteria, debido a que es una clase muy diversa.

La clase Gammaproteobacteria ha sido encontrada en distintos sistemas de DA, por ejemplo: durante la DA de FORSU a 35 °C a pH ~7 (Li *et al.* 2013; Alcántara *et al.* 2017) asociado con la acidogénesis por el primer autor, y durante la DA de estiércol de ganado bajo condiciones termofílicas (54±1 °C) caracterizado con potencial de sulfato reducción y desnitrificación (Campanaro *et al.* 2016). También ha sido reportado en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales como un grupo de microorganismos acumuladores de fosfato durante la remoción de fosfato biológico a temperatura de 20-22 °C a pH 7.0-7.8 (Ge, Batstone, and Keller 2015).

Con base en los trabajos citados, es posible la participación de Gammaproteobacteria NC durante la acidogénesis, así como durante la desnitrificación y eliminación de fosfatos y sulfatos en el tratamiento de aguas residuales.

Actinomicetales NC

No fue posible clasificar esta UTO a nivel taxonómico de género y se discute la importancia del orden Actinomicetales.

Este orden ha sido reportado en la DA de estiércol de ganado bajo condiciones termofílicas (54±1 °C) y caracterizado con capacidad acetogénica utilizando al propionato como sustrato (Campanaro *et al.* 2016), y durante la DA de biomasa microalgal en un *UASB* a 35±2 °C y pH 6-7 en cuyo sistema no se reporta su posible rol metabólico (Doloman *et al.* 2017).

Tomando en cuenta las referencias presentadas, es posible la participación de Actinomicetales NC durante la acetogénesis en el *UASB*.

Desulfobacteraceae NC

No fue posible clasificar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia de la familia Desulfobacteraceae durante la DA.

Se reporta en el Manual Bergey's que las bacterias de la familia Desulfobacteraceae son: sulfato-reductoras, móviles (muchas), anaerobias estrictas, quimiolitótrofas (utilizando sulfato y H₂ como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono) o quimiorganótrofas (oxidando completamente compuestos orgánicos), y fermentativas. Utilizan al sulfato como el principal aceptor de electrones.

La familia Desulfobacteraceae ha sido reportada como poco abundante durante la DA de residuos de cerdo bajo condiciones termofílicas (55-65 °C) a pH 7.1-7.2 en cuyo sistema no se discute su posible rol metabólico (Tzun *et al.* 2017). También ha sido caracterizada durante la DA de hidrocarburos (alcanos) del petróleo crudo (Gray *et al.* 2011).

Por lo anterior, es posible que Desulfobacteraceae NC participe en la acidogénesis, acetogénesis de hidrocarburos y así como en la reducción de sulfato en el *UASB*.

Paludibacter

Según el Manual Bergey's las bacterias del género *Paludibacter* son no móviles, no formadoras de esporas, Gram-negativas, estrictamente anaerobias, quimioorganotróficas, su temperatura óptima de crecimiento es 30 °C, no reductoras de nitrato, fermentan varios azúcares obteniendo acetato y propionato como principales productos finales.

Paludibacter se ha encontrado en la DA de lodo anaerobio de purga a 35 ± 1 °C a pH ~6.5 y fue relacionado con la acidogénesis y acetogénesis (Zhou *et al.* 2016) y ha sido caracterizado dentro de los más abundantes durante la primer etapa de la DA de aguas residuales ricas en sulfato a pH de 6.3 asociado con la producción de AGV y la reducción de sulfato (Shan *et al.* 2017); debido a esto, *Paludibacter* podría participar la hidrólisis-acidogénesis, acetogénesis y reducción de sulfato en el UASB.

Desulfobulbus

De acuerdo al Manual Bergey's la bacterias del género *Desulfobulbus* son Gram-negativas, móviles, estrictamente anaerobias, de metabolismo tipo fermentativas, y quimioorganotrofos (utilizan lactato, piruvato, etanol o 1-propanol como donador de electrones y fuente de carbono). Oxidan componentes orgánicos a acetato, pueden utilizar H₂ como donador de electrones en presencia de acetato. Utilizan sulfato, sulfito y tiosulfato como aceptores de electrones reduciéndolos a H₂S. Su pH óptimo de crecimiento es 6.6-7.5. Su óptima temperatura de crecimiento es 25-40 °C.

Este género bacteriano ha sido caracterizado entre los más abundantes durante la DA de aguas residuales de rastro a 55°C (Jabari *et al.* 2015) Otros autores reportan la presencia de este género bacteriano durante el tratamiento de aguas residuales y relacionadas con la eliminación de alquilbenceno sulfonato linear (Vieira *et al.* 2017).

Debido a lo anterior es posible que la UTO *Desulfobulbus* participe en la acetogénesis y en la reducción del sulfato en el *UASB*.

Proteobacteria NC

Se discute la importancia del *Phyla* Proteobacteria durante la DA ya que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género.

El *Phyla* Proteobacteria es muy diverso, y en el Manual Bergey's no se reportan generalidades sobre éste.

Este *Phyla* ha sido reportado entre los más abundantes en diferentes sistemas de DA (Ma *et al.* 2015; Campanaro *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2016; Keating *et al.* 2016; Fisgativa *et al.* 2017), debido a que es un *Phyla* metabólicamente diverso, consideramos posible la participación de esta UTO durante al hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis así como durante la reducción de sulfato en el *UASB*.

Aeromonas

Se reporta en el Manual Bergey's que las bacterias pertenecientes al género *Aeromonas* son Gram negativas, móviles (muchas), anaerobias facultativas y quimiorganótrofas. Poseen metabolismo oxidativo y fermentativo. Reducen nitrato a nitrito, producen enzimas hidrolíticas. Su crecimiento óptimo es a 22-37 °C.

Se ha reportado la presencia de este género bacteriano durante el tratamiento de aguas residuales contaminadas con alquilbenceno sulfonato lineal, pero no se discute su importancia (Vieira *et al.* 2017). Otros estudios reportan que este género puede participar durante la acidogénesis en la DA, así mismo, que la especie *Aeromonas caviae* es patógena y puede prevalecer en los sistemas de DA.

Por lo anterior *Aeromonas* podría realizar la acidogénesis en el *UASB*; también se recomienda una caracterización de esta UTO a nivel taxonómico de género para cerciorar que no corresponda a una especie patógena.

3.4. Análisis de las comunidades de arqueas

3.4.1. Esfuerzo de secuenciación

Como resultado de la secuenciación masiva de las regiones V6-V8 del gen *16s rRNA* de arqueas del estrato superior de los días 15 y 30, y del lodo anaerobio del *UASB* de los días 1, 15 y 30, se obtuvieron, en total, 274, 451 secuencias las cuáles, después de un proceso de análisis de calidad y selección (Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur), se redujeron a 126, 293 secuencias (Tabla 12) cuya longitud promedio fue de 440 pb.

Las secuencias fueron clasificadas de acuerdo con su similitud con las secuencias del gen *16S rRNA* de la base de datos SILVA en 27 UTO a nivel taxonómico de género, distribuidas en 3 *Phyla*, 4 Clases, 8 Ordenes, 15 Familias (Tabla 12).

En las curvas de rarefacción obtenidas mediante el análisis con el software bioinformático Mothur, se observó un comportamiento con tendencia asintótica en el que las pendientes de las curvas tienden a cero a medida que el número de secuencias aumenta, y la probabilidad de encontrar nuevas UTO disminuye (Figura 22).

Con los datos para graficar las curvas de rarefacción se realizó un análisis de regresión no lineal basada en la función de UTO caracterizadas (Ecuación 1) obteniendo valores de R^2 entre 0.75 y 0.89 y valores de significancia para las ecuaciones de $\alpha < 0.01$ para todas las muestras.

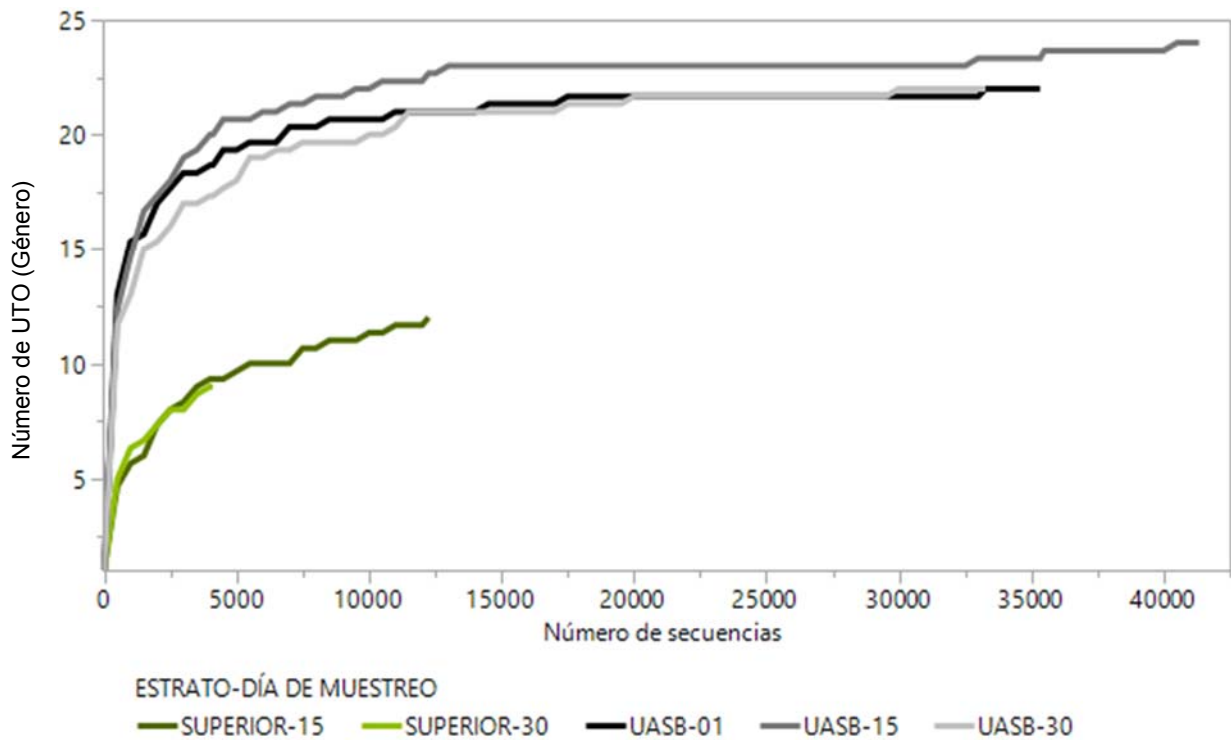


Figura 22. Curvas de rarefacción para las comunidades de arqueas.

Se obtuvo un porcentaje de cobertura mayor al 90% (Tabla 12), por lo que se considera que el esfuerzo de secuenciación fue suficiente para realizar análisis de composición y estructura de las comunidades de arqueas.

Tabla 12 Esfuerzo de secuenciación para las comunidades de arqueas

Muestra	Número de secuencias (nseqs)	Número de UTO caracterizadas (<i>n</i> UTO)	Parámetros ^j		R ²	Pendiente en número de secuencias	Riqueza total de UTO (calculada)	Porcentaje de cobertura
			A	B				
SUPERIO15	12251	12	0.009	0.0007	0.75	9.9E-05	13	92%
SUPERIOR30	4107	9	0.017	0.0017	0.83	2.6-E04	10	90%
UASB01	35334	22	0.0423	0.0019	0.88	8.9E-06	22	100%
UASB15	41329	24	0.036	0.0015	0.89	8.9E-06	24	100%
UASB30	33272	22	0.027	0.0012	0.85	1.6E-05	22	100%

^j Basado en el modelo de acumulación de UTO (Ecuación 1).

3.4.2. Estimadores de biodiversidad

Riqueza

Con la finalidad de conocer la riqueza de cada comunidad de arqueas utilizando un método distinto al modelo de UTO caracterizadas, se estimó número de géneros bacterianos en cada muestra, con el estimador Chao (Tabla 13).

Con base en comparaciones de medias con pruebas t de Student, se reporta con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$ que la riqueza es mayor en las comunidades de arqueas del *UASB* comparadas que en las del *RHALE*. Lo que puede deberse a que en sistemas de *DA2E* la riqueza de arqueas es mayor en reactores de metanogénesis que en los de hidrólisis-acidogénesis (Maus *et al.* 2016; Kirkegaard *et al.* 2017)

Equidad

Calculada con el índice de Shannon-Wiener que adquiere valor de cero cuando hay una sola especie y el $\log(nOTU)$, cuando todas las UTO están representadas por el mismo número de individuos.

Con base en comparaciones de medias con pruebas t de Student, se reporta con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$ que el valor de este índice es mayor en las comunidades del *UASB* en comparación con las comunidades del *RHALE* (Tabla 13). Por lo que las proporciones en que se encuentran los géneros bacterianos son

menos equitativas en la etapa hidrolítica-acidogénica que en la acetogénica-metanogénica.

Dominancia

Estimada con el índice de Simpson manifiesta la probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar de una librería genética pertenezcan a la misma UTO.

Con base en comparaciones de medias con pruebas t de Student, se reporta con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$ que no hay diferencia significativa entre los índices de dominancia de las comunidades microbianas del estrato superior del RHALE y del UASB (Tabla 13). Lo que se debe a que las UTO más abundantes de estas comunidades tienen una ARS mayor al 65%.

Tabla 13. Estimadores de biodiversidad para las comunidades de arqueas^k

Muestra	Número de secuencias ^l	Chao (Riqueza)	Shannon-Wiener (Equidad)	Simpson (Dominancia)
SUPERIOR15	4,107	11	0.49	0.72
SUPERIOR30	4,107	12	0.69	0.55
UASB01	4,107	21	1.46	0.36
UASB15	4,107	22	1.12	0.51
UASB30	4,107	20	0.98	0.59

^k El análisis estadístico de esta sección pueden ser consultado en el [material suplementario](#).

^l Para calcular los estimadores de biodiversidad, se normalizó a 4,107 secuencias por muestra, este número corresponde al máximo alcanzado por el esfuerzo de secuenciación para la muestra con menos secuencias, en este caso SUPERIOR30.

3.4.3. Similitud entre comunidades de arqueas

Comunidades de arqueas en la etapa hidrolítica acidogénica

Las comunidades de arqueas en esta etapa son semejantes en composición y estructura; se obtuvieron correlaciones positivas entre las muestras del estrato superior del RHALE de los días 15 y 30 con un *p-value* de $\alpha < 0.01$ (Tabla 14), por otra parte, al visualizar la distribución de éstas en un *PCA* se distinguió su agrupamiento (Figura 23).

Comunidades de arqueas en la etapa acetogénica-metanogénica

Se obtuvieron correlaciones positivas entre las comunidades bacterianas del *UASB* con un $\alpha < 0.01$ (Tabla 14), por otra parte, al visualizar la distribución de éstas en un *PCA* se observó su agrupamiento (Figura 23); por lo tanto, las comunidades de arqueas del *UASB* son similares en composición y estructura (ver valores relativos en la Tabla 14).

Comunidades de arqueas de las dos etapas de la DA

Tal como ocurrió con las comunidades bacterianas, las comunidades de arqueas de las dos etapas de la DA son diferentes en composición y estructura; se obtuvieron correlaciones cercanas a cero entre las comunidades de arqueas del RHALE y del *UASB* (Tabla 14), y al visualizar la distribución de éstas en un *PCA* se observó que las comunidades del *UASB* se aglomeran en una área distinta del plano a las del RHALE (Figura 23).

Comunidades de arqueas de los diferentes días de muestreo

No se detectó un patrón de correlaciones, ni de agrupamiento con respecto al día de muestreo (Tabla 14 y Figura 23); por lo que si el tiempo impone las condiciones que definen la composición y estructura de las comunidades de arqueas, lo hace en menor grado que la posición de muestreo.

Tabla 14. Correlaciones (arriba) y probabilidad de correlaciones (abajo) entre las comunidades de arqueas.

	SUPERIOR15	SUPERIOR30	UASB01	UASB15	UASB30
SUPERIOR15	1.0000	0.9591	-0.0787	-0.0644	-0.0600
SUPERIOR30	0.9591	1.0000	-0.0897	-0.0732	-0.0680
UASB01	-0.0787	-0.0897	1.0000	0.9889	0.9750
UASB15	-0.0644	-0.0732	0.9889	1.0000	0.9944
UASB30	-0.0600	-0.0680	0.9750	0.9944	1.0000

	SUPERIOR15	SUPERIOR30	UASB01	UASB15	UASB30
SUPERIOR15	<.0001	<.0001	0.7023	0.7545	0.7709
SUPERIOR30	<.0001	<.0001	0.6631	0.7224	0.7412
UASB01	0.7023	0.6631	<.0001	<.0001	<.0001
UASB15	0.7545	0.7224	<.0001	<.0001	<.0001
UASB30	0.7709	0.7412	<.0001	<.0001	<.0001

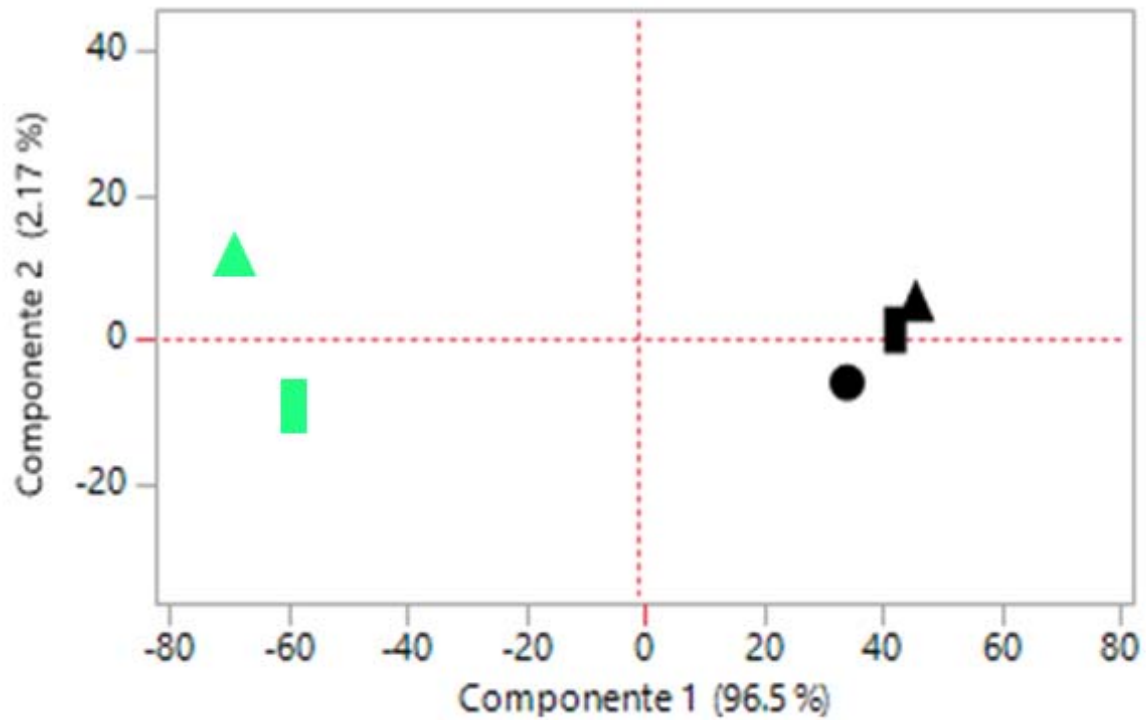


Figura 23. Análisis de componentes principales para las comunidades de arqueas.

Las comunidades de arqueas están representadas de acuerdo a la posición de muestreo con los siguientes colores: **Negro**) Lodo anaerobio del *UASB* y **Verde**) Estrato superior del *RHALE*. Las comunidades bacterianas están representadas de acuerdo a el día de muestreo con las siguientes figuras: ●) Día 1, ■) Día 15 y ▲) Día 30. Los componentes principales 1 y 2 explican en un 96.5 y 2.17% la variación en la composición y estructura de las comunidades microbianas.

3.4.4. Composición y estructura de las comunidades de arqueas.

Considerando que las comunidades de arqueas del RHALE y del *UASB* son distintas y con el objetivo de visualizar las proporciones en que se encuentran los *Phyla*, Clases, Órdenes, Familias y Géneros de arqueas más abundantes del RHALE y del *UASB*, se graficó la abundancia relativa de secuencias (ARS) de las UTO a diferentes niveles taxonómicos (Figura 24 y Figura 25)

Phyla de arqueas

Los *Phyla* de arqueas cuyas ARS son mayores en el estrato superior del RHALE son Euryarchaeota (99.9%), un *Phyla* no clasificado (0.02%) y Crenarchaeota (0.006%) (Figura 24). Así mismo los *Phyla* de arqueas cuyas ARS son mayores en el *UASB* son Euryarchaeota, (99. 7%), Crenarchaeota (0.26%) y un *Phyla* no clasificado (0.03%) (Figura 25).

Clases de arqueas

Las clases de arqueas cuyas ARS son mayores en el estrato superior del RHALE son Methanobacteria, (99. 6%), Methanomicrobia (0.3%) y Thermoprotei (0.01%) (Figura 24). Así mismo las clases de arqueas cuyas ARS son mayores en el *UASB* son Methanomicrobia (80%), Methanobacteria (14%), Euryarchaeota NC (6%) y Thermoprotei (0.3%). (Figura 25).

Órdenes de arqueas

Los órdenes de arqueas cuyas ARS son mayores en el estrato superior del RHALE son Methanobacteriales (99.6%) Methanomicrobiales, (0.1%) y Methanosarcinales (0.2%) (Figura 24). Así mismo los órdenes de arqueas cuyas ARS son mayores en el UASB son Methanosarcinales (89%), Methanomicrobiales (10%), y Euryarchaeota NC (0.5%) (Figura 25).

Familias de arqueas

Las familias de arqueas cuyas ARS son mayores en el estrato superior del RHALE son Methanobacteriaceae (99.6%), Methanosaetaceae, Methanomicrobiales NC (0.09%), Methanospirillaceae (0.02%), Methanocorpusculaceae (0.02%) y Methanomicrobiaceae (0.01%) (Figura 24). Así mismo las familias de arqueas cuyas ARS son mayores en el UASB son Methanosaetaceae (67%), Methanobacteriaceae (14%), Euryarchaeota NC (6%), Methanomicrobiales NC (5%), Methanosarcinaceae (4%) y Methanomicrobiaceae (3%) (Figura 25).

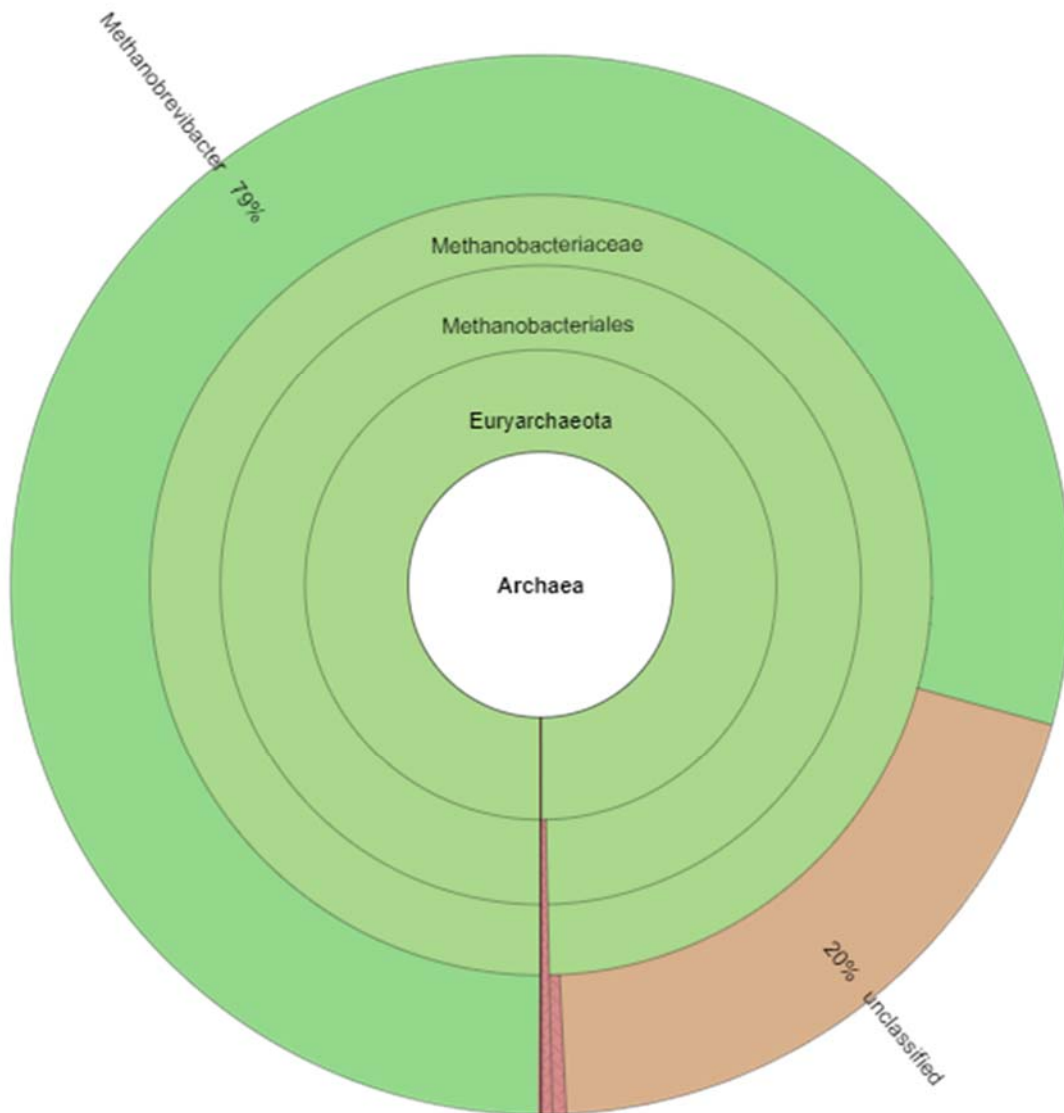


Figura 24. Composición y estructura de la comunidad de arqueas del estrato superior del RHALE.

Se presenta un perfil correspondiente a las muestras del estrato superior de RHALE de los días 15 y 30. Las categorías taxonómicas son representadas del centro a la periferia en el siguiente orden: Dominio, Clase, Orden, Familia y Género. Para visualizar más detalles sobre este gráfico, así como, el perfil de cada muestra consulta el [material suplementario](#).

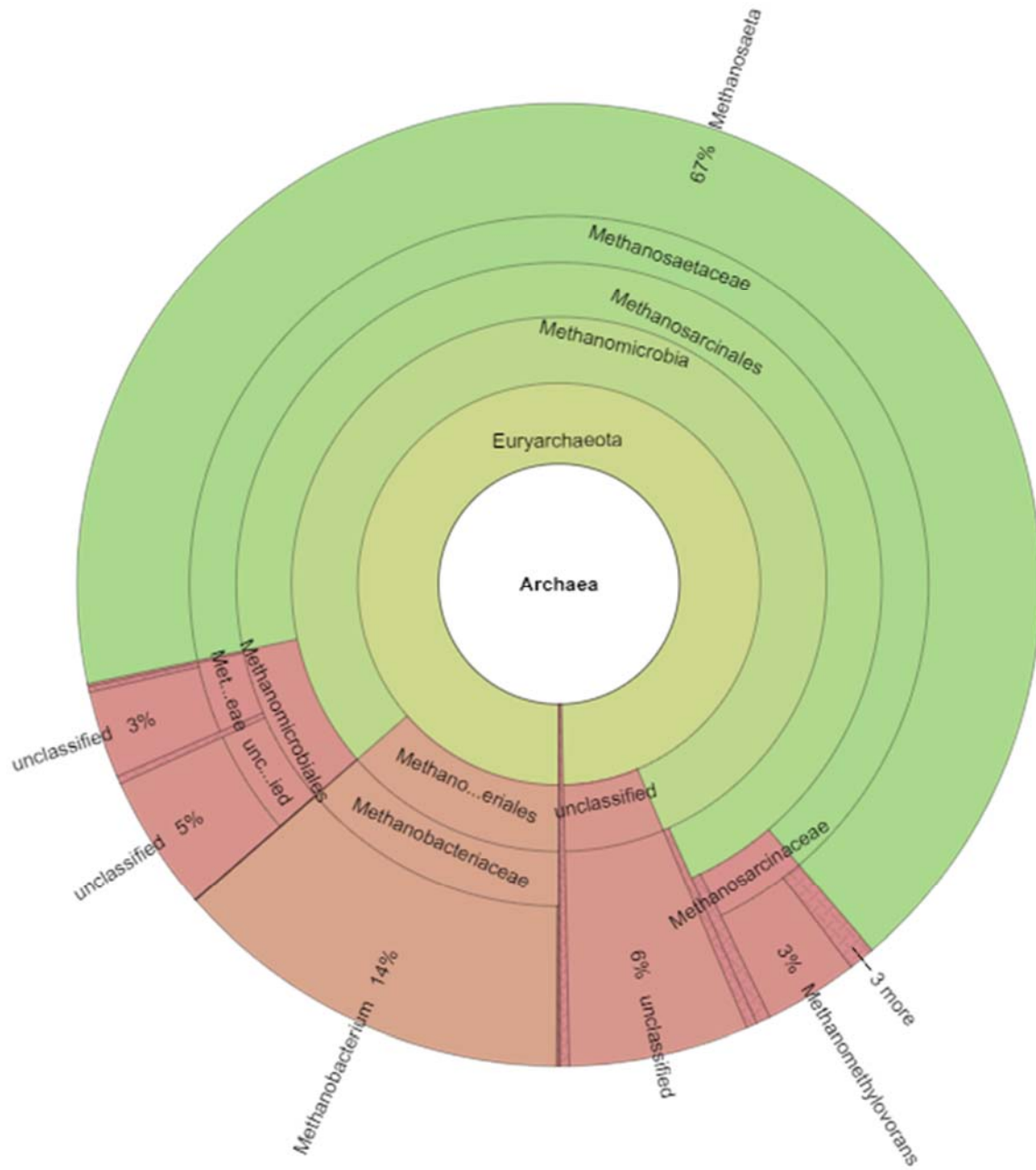


Figura 25. Composición y estructura de la comunidad de arqueas del UASB

Se presenta un perfil correspondiente a todas las muestras del UASB, es decir, a las de los días 1, 15 y 30. Las categorías taxonómicas son representadas del centro a la periferia en el siguiente orden: Dominio, Clase, Orden, Familia y Género. Para visualizar más detalles sobre este gráfico, así como, el perfil de cada muestra consulta el [material suplementario](#).

Géneros de arqueas

Las comunidades de arqueas de ambas etapas de la DA son diferentes en composición y estructura y su composición y estructura a nivel taxonómico de género es la siguiente.

Los géneros de arqueas cuyas ARS son mayores en el estrato superior del RHALE son *Methanobrevibacter* (79%) Methanobacteriaceae NC (20%), *Methanobacterium* (0.4%), *Methanosaeta* (0.14%) (Figura 24). Así mismo los géneros de arqueas cuyas ARS son mayores en el UASB son *Methanosaeta* (67%), *Methanobacterium* NC (14%), Euryarcheota NC (6%), Methanomicrobiales NC (5%), Methanosarcinaceae NC (3%) y *Methanometilovorans* (3%) (Figura 25).

3.4.5. UTO de arqueas más representativas en el sistema de DA2E.

Se discuten aquellas UTO a nivel taxonómico de género cuya ARS es mayor al 1% (Figura 26).

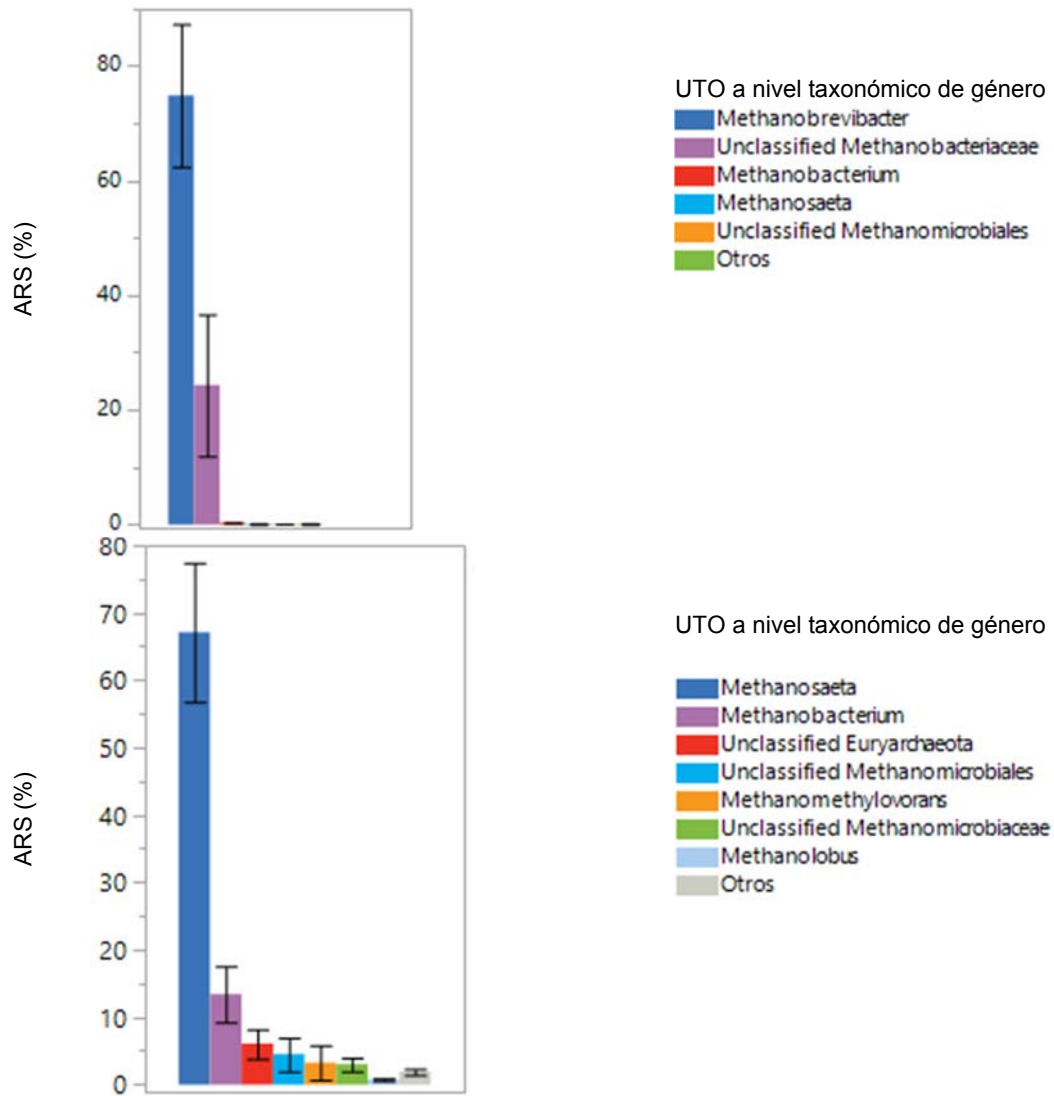


Figura 26. UTO de arqueas más abundantes en el sistema de DA2E

Arriba) Comunidad bacteriana del estrato superior del RHALE. El grupo otros está compuesto por 8 UTO con ARS menor al 0.1% **Abajo)** Comunidad de arqueas del UASB. El grupo otros está compuesto por 18 UTO con ARS menor al 0.7%.

3.4.6. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la primera etapa de la DA.

Se discuten las UTO *Methanobrevibacter* y Methanobacteriaceae NC cuya suma de ARS corresponde al 99% de la comunidad de arqueas de la primera etapa de la DA (Tabla 15).

Tabla 15. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la etapa hidrolítica-acidogénica

Nivel taxonómico		Tipo de metanogénesis	ARS (%)
<i>Phyla</i>	Género		
Euryarchaeota	<i>Methanobrevibacter</i>	H	79
	Methanobacteriaceae NC	H	20

NC No clasificado a nivel taxonómico de Género. X Candidato a tener el rol metabólico en cuestión. H Metanogénica hidrogenotrófica.

Methanobrevibacter

En Manual Bergey's se describe a las arqueas del género *Methanobrevibacter* como: no formadoras de esporas, Gram-positivas (con paredes celulares compuestas por pseudomurina), no móviles y estrictamente anaerobias; pueden obtener energía a partir de la reducción de CO₂ a CH₄ utilizando al H₂ o al formiato como donadores de electrones; utilizan al NH₄ como la principal fuente de nitrógeno, y al acetato como la principal fuente de carbono. Requieren algunas vitaminas del complejo B son como factores de crecimiento.

Este género ha sido reportado entre las arqueas hidrogenotróficas más abundantes durante un estudio en el que se caracterizaron las comunidades microbianas de 32 reactores de DA escala industrial, siendo más abundante bajo condiciones mesofílicas que bajo condiciones termofílicas (Kirkegaard *et al.* 2017); también ha sido encontrado en la DA de FORSU a 37 °C y pH 6.3, en la que fueron adicionados residuos inorgánicos provenientes de la elaboración de papel, ricos en CaCO₃, CaO y otros minerales, en este sistema la presencia de *Methanobrevibacter* ha sido relacionada con la metanogénesis hidrogenotrófica, y con el consumo de acetato y amonio (Zhang *et al.* 2014).

Por lo anterior, y tomando en cuenta que en la primera etapa de la DA el pH es amortiguado con CaCO₃, que el efluente del UASB con que se rocía la FORSU es rico en amonio y otros minerales, y que en esta etapa se produce H₂, CO₂ y que es posible la producción de acetato, se considera que existen las condiciones necesarias para el crecimiento y reproducción del género *Methanobrevibacter* y por ende, es posible la una metanogénesis hidrogenotrófica durante la primera etapa de la DA.

Se recomienda analizar el metabolismo metanogénico en esta etapa con la finalidad de monitorearlo y controlarlo.

Methanobacteriaceae NC

De acuerdo al Manual Bergey's las arqueas de esta familia son típicamente Gram-positivas y anaerobias estrictas. Reducen al S⁰ utilizando al H₂ como donador de electrones. Pueden reducir el CO₂. No catabolizan carbohidratos ni material proteico.

Arqueas de la familia Methanobacteriaceae se han reportado en la DA de residuos de cerdo a pH de 7.1-7.3, siendo poco abundantes bajo condiciones mesofílicas (37 °C) y muy abundantes bajo condiciones termofílicas (55 °C)(Tzun *et al.* 2017), también se han encontrado durante la DA de residuos de cerdo y FORSU a 39°C y pH ~7.5 (Dennehy *et al.* 2017), en ambos casos se le ha asignado el rol metabólico de metanogénica hidrogenotrófica.

Con base en las investigaciones citadas, es posible que Methanobacteriaceae NC realice una metanogénesis hidrogenotrófica durante la primera etapa de la DA en el RHALE. Consecuentemente se recomienda el monitoreo y control de la metanogénesis en la primera etapa de la DA.

3.4.7. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la segunda etapa de la DA.

Se discuten aquellas UTO cuya ARS fue mayor o igual al 1% (Tabla 16).

Tabla 16. Posibles roles metabólicos de las UTO de arqueas más abundantes en la etapa acetogénica-metanogénica.

Nivel taxonómico		Tipo de metanogénesis	Otros	ARS (%)
Phyla	Género			
Euryarchaeota	<i>Methanosaeta</i>	A		67
	<i>Methanobacterium</i>	H		13
	Euryarchaeota NC	A,H o M		6
	Methanomicrobiales NC	H		5
	<i>Methanometilovorans</i>	M		3
	Methanomicrobiaceae NC	H	RS ^o	3
	<i>Methanolobus</i>	H o M		1

NC No clasificado a nivel taxonómico de Género. A Metanogénica acetoclástica. H Metanogénica hidrogenotrófica. M Metanogénica metilotrófica. RS^o Reductora de azufre elemental.

Methanosaeta

En el Manual Bergey's se describen que las arqueas del género *Methanosaeta* tienen estructura tubular, son anaerobias obligadas, no móviles y Gram-negativas. Su temperatura y pH más favorables de crecimiento son 35-40 °C y 6.5-7.5, respectivamente. Utilizan al acetato como única fuente de energía convirtiéndolo a metano y dióxido de carbono.

Methanosaeta se ha encontrado en diferentes sistemas de DA, por ejemplo: en la DA psicrófila y mesófila de FORSU a pH ~8 (Wei and Guo 2017); en la DA de residuos de cerdo a 35 °C a pH de 7.5±0.35 (Pampillón *et al.* 2017); en la DA de FORSU bajo condiciones mesófilas (35°C) a pH ~7.5 (Alcántara *et al.* 2017), reportado entre los géneros más abundantes durante un estudio en el que se caracterizaron las comunidades microbianas de 32 reactores de gran escala (Kirkegaard *et al.* 2017). En todos los casos la presencia de este género de arqueas se ha relacionado con la metanogénesis acetoclástica.

Por lo anterior, es muy probable que la metanogénesis en el *UASB* se lleve a cabo principalmente por la vía acetoclástica siendo la UTO *Methanosaeta* la principal responsable de este proceso.

Methanobacterium

Según el Manual Bergey's las bacterias del género *Methanobacterium* son filamentosas, no formadoras de endosporas Gram-positivas, no móviles, y estrictamente anaerobias. Tienen un crecimiento óptimo a 37-45°C. Obtienen energía a partir de la reducción de CO₂ a CH₄ utilizando al H₂ como donador de electrones. Pueden utilizar amonio como fuente de nitrógeno y sulfito como fuente de azufre.

Se ha reportado al género *Methanobacterium* entre los más abundantes en la DA de celulosa bajo condiciones termofílicas (55 °C) a pH 7 (Vanwonterghem *et al.* 2015) , así como, en la DA de FORSU bajo condiciones mesofílicas (35 °C) a pH 7 (Li *et al.* 2013; Alcántara *et al.* 2017). En todos los casos este género ha sido relacionado con la metanogénesis hidrogenotrófica, con base en estos reportes, es posible que *Methanobacterium* participe durante la metanogénesis hidrogenotrófica en la segunda etapa de la DA en el UASB.

Euryarchaeota NC

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia de este *Phyla* durante la DA.

Los integrantes de este *Phyla*, según el Manual Bergey's, son morfológicamente diversos, pueden ser Gram-negativos o Gram-positivos basadas en la presencia o ausencia de pseudomurina en sus paredes celulares.

El *Phyla* Euryarchaeota es el que más se ha reportado en los sistemas de DA por ejemplo, en la DA de FORSU bajo condiciones mesofílicas (35 °C) a pH 7 (Li *et al.* 2013; Alcántara *et al.* 2017) relacionados con la actividad metanogénica. Otros estudios basados en análisis metagenómicos durante la DA de estiércol de ganado bajo condiciones termofílicas (54±1 °C) han caracterizado UTO Euryarchaeota NC y han determinado que estas tienen capacidad de realizar metanogénesis hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica (Campanaro *et al.* 2016).

Por lo anterior, Euryarchaeota NC podría realizar la metanogénesis hidrogenotrófica, acetoclástica o metilotrófica en la segunda etapa de la DA.

Methanomicrobiales NC

Ya que no se pudo caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia del orden Methanomicrobiales durante la DA; que de acuerdo al Manual Bergey's son anaerobias estrictas. Pueden obtener energía a partir de la reducción de CO₂ a CH₄, utilizando como donadores de electrones al H₂, formiato, o alcoholes. Algunas pueden reducir S⁰ a H₂S.

Methanomicrobiales se ha encontrado en la DA de FORSU bajo condiciones mesofílicas (35 °C) a pH 7 (Li *et al.* 2013; Alcántara *et al.* 2017), en ambos estudios, no se reporta el rol metabólico de este orden. Este orden también ha sido reportado durante la DA de residuos de cerdo a 35 °C a pH de 7.5±0.35 siendo fue relacionado a la metanogénesis hidrogenotrófica (Pampillón *et al.* 2017).

Considerando los reportes citados, es posible la participación de Methanomicrobiales NC en la metanogénesis hidrogenotrófica durante la segunda etapa de la DA en el UASB.

Methanomethylovorans

Este género de arquea ha sido caracterizado entre los menos abundantes durante la DA de residuos de cerdo a 35 °C a pH de 7.5±0.35 y se menciona su posible rol metabólico (Pampillón *et al.* 2017), también ha sido reportado durante la DA de aguas residuales contaminadas con hidróxido de tetrametilamonio bajo condiciones mesofílicas (35±1°C) y pH 7.0±0.2, en cuyo sistema fue relacionado con el consumo de metil para la producción de CH₄ (Liang *et al.* 2015).

Con base en lo mencionado, es posible que *Methanometilovorans* participe durante la degradación de compuestos metilados en el UASB por medio de una metanogénesis metilotrófica.

Methanomicrobiaceae NC

Debido a que no fue posible caracterizar esta UTO a nivel taxonómico de género se discute la importancia de la familia Methanomicrobiaceae en la DA.

En el Manual Bergey's se reporta que las arqueas de esta familia son anaerobias estrictas. Pueden obtener energía a partir de la reducción de CO₂ a CH₄ utilizando como donadores de electrones al H₂, formiato, o en algunas ocasiones alcoholes. Algunas pueden reducir S⁰ a H₂S.

UTO de la familia Methanomicrobiaceae han sido reportadas durante la DA de FORSU en una etapa en estado sólido bajo condiciones mesofílicas (35 °C) a pH 7, (Alcántara *et al.* 2017); esta familia también ha sido reportada como abundante durante la DA de residuos de cerdo bajo condiciones termofílicas (55-65 °C) a pH 7.1-7.2 asociada (Tzun *et al.* 2017), en ambos casos esta familia de arqueas ha sido relacionada con la metanogénesis hidrogenotrófica.

Por ende, es posible que Methanomicrobiaceae NC produzca CH₄ a partir del CO₂ y H₂, así como, H₂S a partir de H₂ y S⁰ durante la segunda etapa de la DA en el UASB.

Methanolobus

Las arqueas de este género descritas en el Manual Bergey's son Gram-negativas, anaerobias estrictas. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Utilizan como sustratos catabólicos al metanol, metilaminas, y algunos metil-sulfuros. Puede transformar al CH₄ y CO₂ en metanol, en presencia de S⁰ o H₂S.

Methanolobus ha sido caracterizado entre los menos abundantes durante la DA de residuos de cerdo a 35 °C bajo un pH de 7.5±0.35 y no se menciona su rol metabólico (Pampillón *et al.* 2017). Sin embargo, en otros ecosistemas ha sido caracterizado como metilotrófica (Antony, Murrell, and Shouche 2018).

Debido a esto, es posible que la UTO *Methanolobus* degrade compuestos metilados, en caso de que existan en el UASB, o que consuma los CH₄ y CO₂ producidos en la segunda etapa de la DA.

4. Conclusiones

1. Las composiciones de las comunidades microbianas de ambas etapas de la digestión anaerobia son distintas.

En la etapa hidrolítica-acidogénica las UTO más representativas a nivel taxonómico de género son: con respecto a la comunidad bacteriana, Prevotellaceae NC (51%), *Megasphaera* (16%), *Lactobacillus* (10%), *Prevotella* (5%) y Lactobacillaceae NC; y con respecto a la comunidad de arqueas, *Methanobrevibacter* (79%) y Methanobacteriaceae NC (20%).

En la etapa acetogénica-metanogénica la comunidad bacteriana estuvo representada por las UTO Bacteroidetes NC (22%), *Pseudomonas* (18%), Comamonadaceae NC (6%), *Clostridium* sensu stricto (5%), Clostridiaceae NC (3%), *Desulfomicrobium* (3%) y Bacteria NC (3%); mientras que en la comunidad de arqueas las UTO más abundantes fueron *Methanosaeta* (67%), *Methanobacterium* NC (14%), Euryarcheota NC (6%), Methanomicrobiales NC (5%), Methanosarcinaceae NC (3%) y *Methanometilovorans* (3%).

2. Las estructuras de las comunidades de microbianas en la DA2E de la FORSU se mantuvieron significativamente estables en el periodo de estudio, indicando así, que estaban adaptadas a las condiciones de operación del sistema.
3. Las estructuras de las comunidades bacterianas en la etapa hidrolítica-acidogénica son afectadas por la posición en un reactor con alto contenido de sólidos orgánicos; haciendo que las abundancias relativas de secuencias (ARS)

de *Megasphaera* y *Acetobacter* sean mayores en el estrato inferior del RHALE que en el superior. Las ARS en los estratos inferior, medio y superior son: para *Megasphaera*, 24 ± 5 , 10 ± 8 y 4 ± 3 ; y para *Acetobacter*, 1.2 ± 0.1 , 0.9 ± 0.3 y 0.5 ± 0.2 .

No fue posible conocer el efecto de la posición en el RHALE sobre la estructura de las comunidades de arqueas debido a que no se obtuvieron perfiles de las comunidades de arqueas en los estratos inferior y medio.

4. En la primera etapa al menos el 87% de la comunidad bacteriana corresponde a *taxa* con potencial hidrolítico-acidogénico, así mismo, el 68% de esta comunidad tiene potencial acidogénico. El 99% de la comunidad de arqueas pertenece a *taxa* con potencial metanogénico hidrogenotrófico. La comunidad microbiana de esta etapa se desarrolló bajo pH de 5.2 y fue responsable de la solubilización del 84% de la DQO alimentada, reduciendo la FORSU al 25% de su masa original. La comunidad microbiana en la segunda etapa tiene capacidades hidrolítica-acidogénica, acetogénica y metanogénica. De la comunidad bacteriana; al menos el 61% tiene potencial hidrolítico-acidogénico y al menos el 49% tiene capacidad acidogénica. De la comunidad de arqueas; al menos el 67% tiene la capacidad metanogénica acetoclástica y al menos el 22% puede llevar a cabo la metanogénesis hidrogenotrófica. La comunidad microbiana de la etapa acetogénica-metanogénica, desarrollada bajo un pH de 8.1, fue responsable de la remoción del 64% de la DQO que alimento al UASB, produciendo 3,300 L de CH₄ por Kg de DQO alimentada.

5. No existe diferencia significativa entre las riquezas taxonómicas de las comunidades bacterianas de la DA2E. Los valores de Chao en los diferentes puntos del sistema son, para el RHALE; en el estrato inferior, 205; en estrato medio, 181; en estrato superior, 165; y en el UASB, 234.
6. La riqueza de arqueas es significativamente mayor en la primera etapa de la DA que en la segunda. Los valores de Chao para las comunidades de arqueas son: en el estrato superior del RHALE, 12, y en lodo anaerobio del UASB, 20.
7. Las estructuras de las comunidades microbianas fueron menos equitativas en la etapa hidrolítica-acidogénica que en la acetogénica-metanogénica. Para las comunidades bacterianas, las equidades promedio en los estratos inferior, medio y superior del RHALE fueron 2.0, 1.8 y 1.6 respectivamente; y en el lodo anaerobio del UASB fue 3.0. Para las comunidades de arqueas, la equidad promedio del estrato superior del RHALE fue 0.6 y en el lodo anaerobio del UASB fue 1.2.
8. Es posible que exista una especie de *Acetobacter* anaerobia, cuya ARS en la comunidad bacteriana de la etapa hidrolítica-acidogénica fue 1%. Esto sería contrario a lo reportado actualmente para este género bacteriano.
9. Pese a que se detectaron arqueas hidrogenotróficas en el estrato superior del RHALE; es muy probable que no haya arqueas en los estratos medio e inferior o que su abundancia relativa en las comunidades microbianas sea muy baja. Lo anterior se debe a que no fue posible detectar mediante PCR al gen 16S rRNA de arqueas en los estratos medio e inferior, pero sí al de bacterias; y a que la DQO

no contabilizada, que podría ser transformada en metano por arqueas hidrogenotróficas, correspondió al sólo el 6% de la DQO total alimentada.

10. La comunidad bacteriana de la segunda etapa de la DA también tiene capacidades metabólicas relacionadas con el tratamiento anaerobio de aguas residuales como: desnitrificación, reducción de fosfato, reducción de sulfato, reducción de azufre elemental; también actividades que compiten con la metanogénesis, como el consumo de AGV.
11. El 4% de la comunidad de arqueas del lodo anaerobio corresponde a UTO con capacidad de producir metano a través de hidrocarburos y compuestos metilados.

5. Recomendaciones

1. Es posible que la concentración de arqueas en la comunidad microbiana de la etapa hidrolítica-acidogénica sea muy baja comparada con la de bacterias. Para comprobar esta hipótesis se recomienda hacer un análisis cuantitativo del gen *16s rRNA* de bacterias y arqueas por medio de qPCR utilizando los mismos *primers* utilizados en este estudio.
2. Debido a la presencia de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas en el RHALE es posible la producción de metano en este reactor; por lo que se recomienda un monitoreo y control del metabolismo metanogénico en esta etapa.
3. Debido a la presencia de microorganismos sulfato reductores en ambas etapas de la DA es posible la producción de H₂S, por lo que se recomienda un monitoreo y control de la emisión de este gas durante las dos etapas de la DA de FORSU.
4. Debido a que de bacterias posiblemente patógenas (*Prevotella*, *Clostridium* y *Aeromonas*) fueron caracterizadas entre las más abundantes durante la DA de FORSU en dos etapas; se recomienda su caracterización a nivel de especie, así como, su cuantificación en caso de ser patógenas.

6. Bibliografía

- Aguirre, J. F. (2005). *Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en fase semisólida*. (Tesis de Maestría) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Alcántara, R. J., Taş, N., Carlos, S., Durán, A., & Falcón, L. I. (2017). Microbial dynamics in anaerobic digestion reactors for treating organic urban residues during the start-up process. *Letters in Applied Microbiology*, *64*, 438–445. <https://doi.org/10.1111/lam.12734>
- Antony, C. P., Murrell, J. C., & Shouche, Y. S. (2018). Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanolobus* sp. as active methylotrophic Archaea in Lonar crater lake sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, *81*, 43–51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01274.x>
- Bi, S. J., Hong, X. J., Wang, G. X., Li, Y., Gao, Y. M., Yan, L., & Wang, Y. J. (2016). Effect of domestication on microorganism diversity and anaerobic digestion of food waste. *Genetics and Molecular Research*, *15*(3), 1–14.
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P. G., De Francisci, D., Valle, G., & Angelidaki, I. (2016). Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(26), 2-17. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0441-1>
- Chernov, T. I., Tkhakakhova, A. K., & Kutovaya, O. V. (2015). Assessment of diversity indices for the characterization of the soil prokaryotic community by metagenomic analysis. *Eurasian Soil Science*, *48*(4), 410–415. <https://doi.org/10.1134/S1064229315040031>
- Cuetero, Y. (2015). *Caracterización molecular de las comunidades bacterianas presentes en un biorreactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (HALE) implicadas en la degradación de residuos sólidos orgánicos (RSO)*. (Proyecto de Investigación) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J., Gregory, R., Darby, A. C., ... Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*, *17*(55), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>

- Dennehy, C., Lawlor, P. G., McCabe, M. S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X. and Gardiner, G. E. (2017). Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Management*, 71, 532–541. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.047>
- Ding, C., Ma, T., Hu, A., Dai, L., He, Q., Cheng, L., & Zhang, H. (2015). Enrichment and Characterization of a Psychrotolerant Consortium Degrading Crude Oil Alkanes Under Methanogenic Conditions. *Environmental Microbiology*, 70, 433–444. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0590-y>
- Doloman, A., Soboh, Y. M., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2017). Microbial Dynamics During Anaerobic Digestion of Microalgal Biomass and Sodium Acetate in UASB Reactors. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1–12.
- Fisgativa, H., Tremier, A., Le Roux, S., Bureau, C., & Dabert, P. (2017). Understanding the anaerobic biodegradability of food waste: Relationship between the typological, biochemical and microbial characteristics. *Journal of Environmental Management*, 188, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.058>
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., & Lebuhn, M. (2015). Fate of Clostridium botulinum and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 936–947. <https://doi.org/10.1111/jam.12909>
- Gaby, J. C., Zamanzadeh, M., & Horn, S. J. (2017). The effect of temperature and retention time on methane production and microbial community composition in staged anaerobic digesters fed with food waste. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0989-4>
- Ge, H., Batstone, D. J., & Keller, J. (2015). Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade Comamonadaceae. *Water Research*, 69, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.026>
- Giuliano, A., Zanetti, L., Micolucci, F., & Cavinato, C. (2014). Thermophilic two-phase anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste for bio-hythane production: effect of recirculation sludge on process stability and microbiology over a long-term pilot-scale experience. *Water Science & Technology*. 69 (11), 2200–2209. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.137>

- Gray, N. D., Sherry, A., Grant, R. J., Rowan, A. K., Hubert, C. R. J., Callbeck, C. M., ... Head, I. M. (2011). The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2957–2975. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02570.x>
- Gunnigle, E., Siggins, A., Botting, C. H., Fuszard, M., Flaherty, V. O., & Abram, F. (2015). Low-temperature anaerobic digestion is associated with differential methanogenic protein expression. *FEMS Microbiology Letters*, 362(10), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv059>
- Hoornweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management. *World Bank, Washington DC*, 9. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHAT+A+WASTE:+A+global+review+of+solid+waste+management#0>
- INEGI. (2014). *Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2014*. México. Retrieved from http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/aegeum/702825063979.pdf
- Jabari, L., Gannoun, H., Khelifi, E., Cayol, J.-L., Godon, J., Morktar, H., & Fardeau, M. (2015). Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.029>
- Jang, H. M., Kim, J. H., Ha, J. H., & Park, J. M. (2014). Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Bioresource Technology*, 165(C), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.028>
- Ju, F., & Zhang, T. (2015). Experimental Design and Bioinformatics Analysis for the Application of Metagenomics in Environmental Sciences and Biotechnology. *Environmental Science and Technology*, 49(21), 12628–12640. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03719>
- Keating, C., Chin, J. P., Hughes, D., Manesiotis, P., Cysneiros, D., Mahony, T., ... Flaherty, V. O. (2016). Biological Phosphorus Removal During High-Rate, Low-Temperature, Anaerobic Digestion of Wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 7(226), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00226>

- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31(8), 1737–1744. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>
- Kirkegaard, R. H., Mcllroy, S. J., Kristensen, J. M., Nierychlo, M., Karst, S. M., Dueholm, M. S., ... Nielsen, P. H. (2017). The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09303-0>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq, 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Li, A., Chu, Y., Wang, X., Ren, L., Yu, J., Liu, X., ... Li, S. (2013). A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnology for Fuels*, 6(1), 1–17.
- Li, Y., Park, S. Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>
- Liang, W., Tai, H., Pao, G., Yu, H., Toshikazu, F., Yi, W., & Shao, C. (2015). Molecular analysis of methanogens involved in methanogenic degradation of tetramethylammonium hydroxide in full-scale bioreactors. *Environmental Microbiology*, 99, 1485–1497. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6058-z>
- Lindner, J., Zielonka, S., Oechsner, H., & Lemmer, A. (2015). Effect of different pH-values on process parameters in two-phase anaerobic digestion of high-solid substrates. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(2), 198–207. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.941944>
- Ma, Q., Qu, Y., Zhang, X., Liu, Z., Li, H., Zhang, Z., ... Zhou, J. (2015). Systematic investigation and microbial community profile of indole degradation processes in two aerobic activated sludge systems. *Scientific Reports*, 5, (17674), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep17674>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(31), 1-3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., ... Klocke, M.

- (2016). Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0581-3>
- Meng, X., Lu, S., Yang, J., Jin, D., Wang, X., Bai, X., ... Xu, J. (2017). Metataxonomics reveal vultures as a reservoir for *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes & Infections*, 6(2), 1-8. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.137>
- Min, H., Hyub, J., Moon, J., Kim, M., & Sommer, S. G. (2015). Comprehensive microbial analysis of combined mesophilic anaerobic e thermophilic aerobic process treating high-strength food wastewater. *Water Research*, 73, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.038>
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad . M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1.*
- Narihiro, T., Nobu, M. K., Kim, N.-K., Kamagata, Y., & Liu, W.-T. (2014). The nexus of syntrophy-associated microbiota in anaerobic digestion revealed by long-term enrichment and community survey. *Environmental Microbiology*. 2014, 1-13 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12616>
- Narihiro, T., & Sekiguchi, Y. (2007). Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.003>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12(385), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Pampillón, L., Ortiz, N. L., Luna, M., Dendooven, L., & Navarro, Y. E. (2017). Archaeal and Bacterial Community Structure in an Anaerobic Digestion Reactor (Lagoon Type) Used for Biogas Production at a Pig Farm. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 90070, 306–317. <https://doi.org/10.1159/000479108>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

- Poszytek, K., Pyzik, A., Sobczak, A., Lipinski, L., Sklodowska, A., & Drewniak, L. (2017). The effect of the source of microorganisms on adaptation of hydrolytic consortia dedicated to anaerobic digestion of maize silage. *Anaerobe*, *46*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.011>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Peplies, J., ... Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, *57*, 369–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
- Resende, J. A., Diniz, C. G., Silva, V. L., Otenio, M. H., Bonnafous, A., Arcuri, P. B., & Godon, J. (2014). Dynamics of antibiotic resistance genes and presence of putative pathogens during ambient temperature anaerobic digestion. *Journal of Applied Microbiology*, *117*, 1689–1699. <https://doi.org/10.1111/jam.12653>
- Rodríguez, I., Regueiro, L., Pena, R., Álvarez, J. A., Lema, J. M., & Carballa, M. (2014). Feasibility of spent metalworking fluids as co-substrate for anaerobic. *Bioresource Technology*, *155*, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.090>
- Rodríguez, R.I. (2015). *Digestión Anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos en Dos Fases*. (Tesis de Doctorado) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Rodríguez, R., Rodríguez, S., Monroy, O., & Ramírez, F. (2015). Producción de metano a partir de la mezcla del lixiviado de residuos sólidos urbanos y el agua residual municipal. *Revista Cubana de Química*, *27*(3), 243–251. Retrieved from <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq>
- Rubin, B. E. R., Sanders, J. G., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Gilbert, J. A., & Moreau, C. S. (2014). DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen*, *3*(6), 910–921. <https://doi.org/10.1002/mbo3.216>
- Shan, L., Zhang, Z., Yu, Y., Ambuchi, J. J., & Feng, Y. (2017). Performance of CSTR – EGSB – SBR system for treating sulfate-rich cellulosic ethanol wastewater and microbial community analysis. *Environ Sci Pollut Res*, *24*, 14387–14395.

<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9022-5>

- Shin, S. G., Han, G., Lim, J., Lee, C., & Hwang, S. (2010). A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Water Research*, 44(17), 4838–4849. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.019>
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F., & Mass??, D. I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research*, 42(3), 513–537. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.003>
- Tanveer, A., Yadav, S., & Yadav, D. (2016). Comparative assessment of methods for metagenomic DNA isolation from soils of different crop growing fields. *3 Biotech*, 6(2), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0543-2>
- Tzun, G., An, L., Chieh, W., Chu, C., & Daryi, W. (2017). Inferring microbial interactions in thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of hog waste. *PLoS ONE*, 12(7), 1–22.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Rabaey, K., & Tyson, G. W. (2015). Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Scientific Reports*, 5, 8496. <https://doi.org/10.1038/srep08496>
- Vieira, C., Palladino, T., Yukio, D., & Amancio, M. (2017). Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. *Environmental Technology*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1414317>
- Vo, A.-T. E., & Jedlicka, J. A. (2014). Protocols for metagenomic DNA extraction and Illumina amplicon library preparation for faecal and swab samples. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1183–1197. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12269>
- Wei, S., & Guo, Y. (2017). Comparative study of reactor performance and microbial community in psychrophilic and mesophilic biogas digesters under solid state condition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2017.12.001>
- Williams, A. G., Withers, S., & Sutherland, A. D. (2012). The potential of bacteria isolated from ruminal contents of seaweed-eating North Ronaldsay sheep to

hydrolyse seaweed components and produce methane by anaerobic digestion in vitro. *Microbial Biotechnology*, 6, 45–52. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12000>

Xia, Y., Wang, Y., Fang, H. H. P., Jin, T., Zhong, H., & Zhang, T. (2014). Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep06708>

Zhang, J., Wang, Q., Zheng, P., & Wang, Y. (2014). Anaerobic digestion of food waste stabilized by lime mud from papermaking process. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 170, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.003>

Zhou, A., Liu, W., Varrone, C., Wang, Y., Wang, A., & Yue, X. (2015). Evaluation of surfactants on waste activated sludge fermentation by pyrosequencing analysis. *Bioresourcetechnology*, 192, 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.017>

Zhou, A., Zhang, J., Wen, K., Liu, Z., Wang, G., Liu, W., & Wang, A. (2016). What could the entire cornstover contribute to the enhancement of waste activated sludge acidification? Performance assessment and microbial community analysis. *Biotechnology for Biofuels*, 9(241), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0659-y>

7. Anexos

Anexo A. Aparato para muestreo estratificado en el RHALE.

Objetivo: Colectar FORSU en proceso de posiciones específicas del RHALE sin destruir la composición del lecho.

Se diseñó un aparato de fácil deslizamiento en el RHALE, con un recipiente herméticamente cerrado que sólo se abre y cierra en la posición (altura) de colecta deseada, compuesto por los siguientes elementos:

- A) Soporte en forma de “L” de 2 m de alto y 0.25 m de ancho, hecho con cuadrado de hierro de 0.75 in de ancho.
- B) Recipiente colector reemplazable (lata de aluminio reciclada de 0.11m de alto y 0.074 m de diámetro y con perforación de 0.25 in de ancho en el centro de la base)
- C) Tapa (pelota de esponja de 2 in de diámetro, con perforación de lado a lado de 0.25 in de ancho)
- D) Palanca en forma de “T” de 1.90 m de largo y manubrio de 0.15 m de ancho, hecha con tubo de hierro de 0.5 in al que en la parte inferior se soldó un esparrago de 0.37 in de ancho y 0.1 m de largo con la finalidad de atornillar la palanca a la tapa.
- E) Dos guías de palanca de 0.15 m de largo soldadas al soporte, cada una hecha con cuadrado de hierro de 0.75 in y con un anillo de hierro de 0.5 in de diámetro y 0.01 m de grosor, soldado en el extremo.

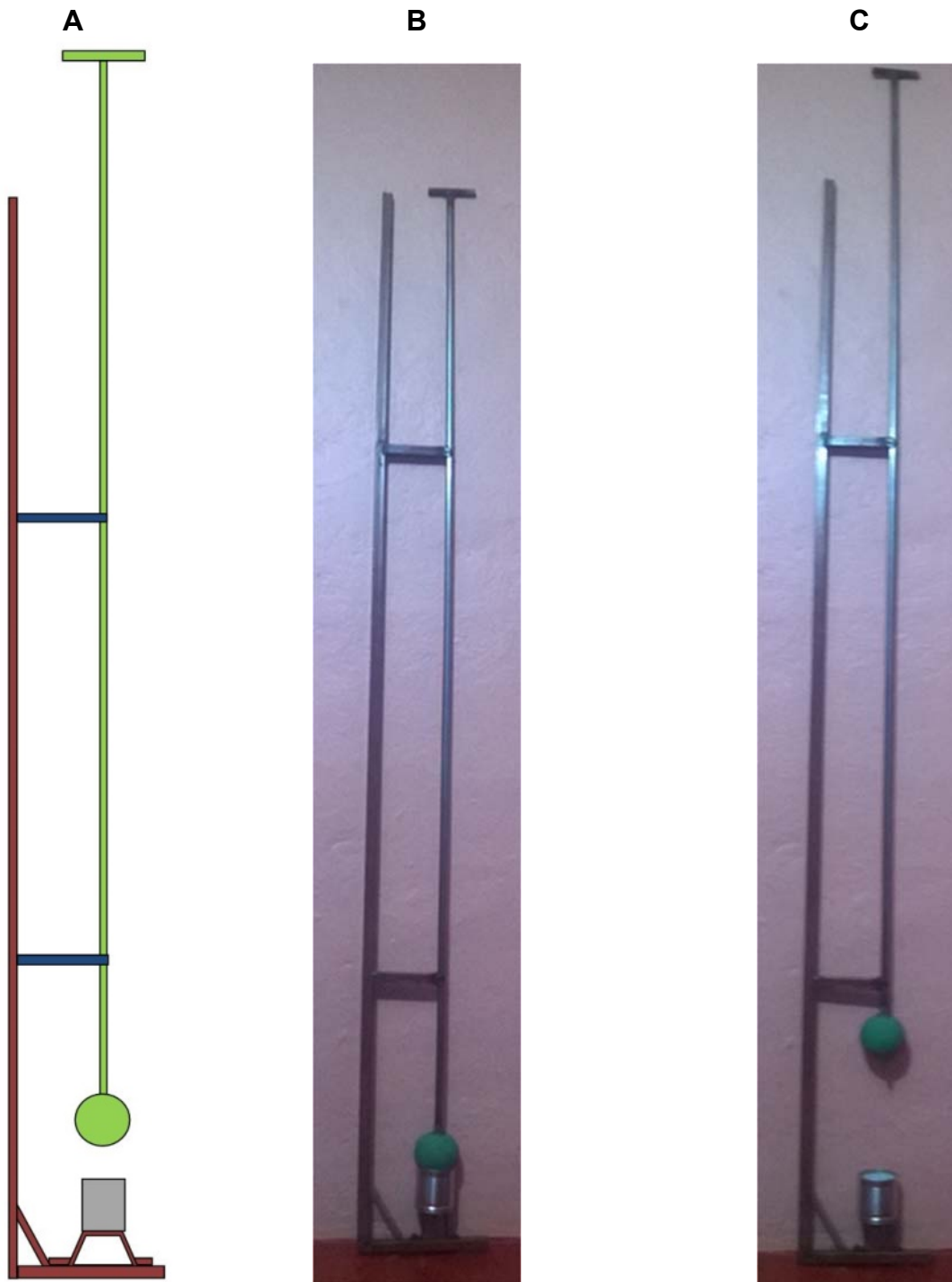


Figura A. Aparato de muestreo.

A: Esquema **Rojo)** Soporte; **Gris)** Recipiente; **Verde)** Tapa con palanca, y **Azul)** Guía de la palanca. **B y C:** Fotografías con el recipiente cerrado y abierto respectivamente.

Anexo B. Electroforesis en gel de agarosa

Objetivos: Visualizar el *DNA* en los extractos y en los productos de *PCR*.

Procedimiento

1. En un matraz Erlenmeyer de 100ml se prepararon 20 ml de solución de agarosa al 10% utilizando como disolvente TAE 1X.
2. Se calentó la solución hasta disolver completamente la agarosa.
3. Se sirvió la solución en el molde, se colocó el peine y dejando que solidifique.
4. Se introdujo el gel a la cámara de electroforesis con los pozos en el lado del cátodo.
5. Se llenó la cámara de TAE 1X hasta cubrir el gel.
6. Se cargaron los pozos, uno con el marcador de peso molecular *1KB DNA Ladder Promega* y los demás con una mezcla de 3 μ L de extracto de *DNA* y 1.5 μ L de buffer de carga.
7. Se corrió el gel a 100v durante 15 minutos.
8. Se introdujo el gel en una solución de Bromuro de Etidio al 0.01% durante 15 min.
9. Se visualizó el gel con un transiluminador UV UltraLum Meb-20 y, con una longitud de onda de 300nm, adaptado al sistema Kodak Edas 290 el software Kodak 1D 3.6.
10. Se guardó la imagen en formato jpg.

Anexo C. Cuantificación del *DNA* con NanoDrop

Objetivo: Cuantificar la concentración de *DNA* extraído.

Procedimiento

1. Se encendió la computadora
2. Se ejecutó el programa NanoDrop™ 2000/2000c ubicado en el escritorio.
3. Se seleccionó la aplicación *Nucleic Acid*.
4. Se encendió el NanoDrop.
5. Se colocó 1 μL de agua MQ en la placa de lectura del y se limpió con papel seda.
6. Se colocaron 2 μL de agua MQ en la placa de lectura del NanoDrop.
7. Se eligió la opción de *Blank Water* (blanco de agua).
8. Se limpió el NanoDrop con papel seda.
9. Se colocaron 2 μL de *DNA* extraído.
10. Se dio click en la opción Play para tomar lectura de la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y de la pureza del *DNA*.
11. Se limpió el NanoDrop con 2 μL de agua y papel seda.
12. Se repitieron los pasos del 9 al 11 para las demás muestras.

Anexo D. Amplificación del gen 16S rRNA de arqueas y bacterias

Objetivo: Verificar que en los *DNA* extraídos se encuentra el gen 16s rRNA de arqueas y bacterias amplificándolo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*).

Nota preliminar: Para la amplificación del 16S rRNA de arqueas y bacterias se sigue el mismo procedimiento, sólo cambia el par de *primers* a utilizar, en este estudio se usaron los *primers* para arqueas Arq571f y Arq1017r que codifican para las región V4-V6, y los *primers* para bacterias GC968f y 1401r que codifican para las región V6-V8 (Tabla 1D).

Tabla 1D. Primers para arqueas y bacterias

Nombre	Secuencia	
<i>Primers para arqueas</i>		
<i>Forward</i>	Arq571f	5'-GCYTAAAGSRNCCGTAGC-3'
<i>Reverse</i>	Arq1017f	5'- GGCCATGCACCWCCTCTC-3'
<i>Primers para bacterias</i>		
<i>Forward</i>	GC968f	5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACGC AAGAACCTTACC-3'
<i>Reverse</i>	1401r	5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'

Procedimiento

1. Se colocaron los siguientes materiales, previamente esterilizados en autoclave, dentro de la campana para *PCR* dónde se prendió la lámpara de luz UV por 15 min para sanitizarlos: 1) cajas de puntas de 200 μ L; 2) Caja de puntas de 1000 μ L, 3) tubos de Eppendorf para *PCR* de 200 μ L y gradilla, 4) Tubo Eppendorf de 2000 μ L y gradilla 5) Pipetas de 10, 50, 200 y 1000 μ L.
2. Se tomaron los reactivos para *PCR* (Tabla 1) almacenados a -20°C y se descongelaron a temperatura ambiente.

3. Una vez descongelados, los reactivos para *PCR* fueron colocados sobre un bloque térmico para tubos de 2000 μL , previamente almacenado a -20°C .
4. Transcurridos los 15 minutos de radiación UV en la campana para *PCR*, se colocó el bloque térmico con los reactivos para *PCR* al lado de la campana.
5. Se prepararon 25 μL de mezcla para cada reacción de *PCR* (Tabla 2D) en tubos Eppendorf de 200 μL , es decir, para los 12 *DNA* extraídos, para un control positivo (*DNA* de reactores previamente amplificado) y para el control negativo (agua ultra pura).

Tabla 2D. Mezcla de reacción para la *PCR*

Reactivo	Concentración Inicial (Alícuota)	Volumen (μL)	Concentración inicial (Solución de <i>PCR</i>)
Agua ultra pura	No aplica	16.8	No Aplica
Buffer	10X	2.5	1X
Cloruro de Magnesio	25mM	1.5	1.5 mM
dNTP's	100mM	1	4 mM
Primer <i>forward</i> 968GC	10mM	1	0.4 mM
Primer <i>reverse</i> 1401r	10mM	1	0.4 mM
Taq Polimerasa	5 U/ μL	0.2	0.4 U/1 μL
<i>DNA</i> molde (Extracto de <i>DNA</i>)	1:10	1	1:250
Volumen final		25 mL	

6. Se centrifugaron los tubos Eppendorf con mezcla de reacción durante 10 segundos a 1000 rpm.
7. Se colocaron los tubos dentro del termociclador de punto final.
8. Se programó el termociclador en las siguientes condiciones: primero, 94°C durante 5 minutos para la desnaturalización inicial; segundo, 94°C durante 30 segundos para la desnaturalización; tercero, 55°C (para arqueas) o 57°C (para bacterias) durante 30 segundos para el alineamiento; cuarto, 72°C durante 40

segundos para el alargamiento, y por último, 72°C durante 7 minutos para el alargamiento final.

Nota: Se realizaron 35 ciclos del paso 2 al 4 antes de pasar al alargamiento final.

9. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo B. Electroforesis en) para visualizar el *DNA* en los productos de la *PCR*.

Bibliografía

1. Aguirre, J. F. (2005). Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores de fase semisólida (Tesis de maestría) Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. México.
2. Hernández, L. M. (2014). Diversidad bacteriana y de los genes de las rutas quimiolitotróficas obtenidos a partir de DNA metagenómico extraído de jales de minas del Estado de Durango y Zacatecas (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. México.
3. Bravo, G. (2015). Caracterización de la microbiota intestinal de un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. México.

Anexo E. Análisis bioinformático del gen *16S rRNA* metagenómico con el software bioinformático Mothur

Para este análisis se accedió al servidor de la Estación Experimental de Zaidin (EEZ) dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en España, conectándose con la dirección `quechua09@161.111.252.27` desde una PC con sistema operativo Ubuntu 14.04.2 LTS.

La siguiente serie de pasos se basan en el MiSeq SOP -Mothur disponible en el link https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP.

1. Preparación de archivos.

1.1 Paquete de secuencias.

1. Se ingresó al servidor desde el entorno gráfico de Ubuntu siguiendo la ruta “Archivos → Conectarse con una dirección de servidor de red” y se ingresó la dirección `sftp://quechua09@161.111.252.27/home/quechua09` y la contraseña.
2. Se crearon las carpetas de trabajo “Bacteria” y “Arquea”
3. Se copiaron los paquetes de secuencias (archivo.tar) de arqueas y bacterias recibidos del Integrated Microbiome Resource (IMR), de la PC a las carpetas de trabajo, de manera correspondiente.
4. Se ingresó al servidor desde la terminal de Ubuntu con el comando:

```
ssh -Y quechua09@161.111.252.27
```

5. Se entró a la carpeta de trabajo, indicando la dirección dónde esta se encontraba, con el comando:

`cd Escritorio/datos/.../ bacteria` o `cd Escritorio/datos/.../ arquea` según fuera el caso.

6. En ambas carpetas se descomprimió el archivo.tar con el comando:

`tar -xvf archivo.tar`

7. El comando anterior generó archivos.fastq.gz , dos por cada muestra de *DNA* extraído, que se descomprimieron uno a uno para obtener paquetes de secuencias en formato “fastq” con el comando:

`gzip -d archivo.fastq.gz`

1.2 Documento “stability, files”

1. Se creó el documento “stability.files” con el editor de textos en el que por cada muestra a analizar debe haber una fila compuesta de 1) Etiqueta, 2) Espacio, 3) Paquete de secuencias *forward*, 4) Espacio y 5) Paquete de secuencias *reverse* como se muestra a continuación^m:

Para análisis de secuencias bacterianas:

```
SUPERIOR01 RAR01_S142_L001_R1_001.fastq RAR01_S142_L001_R2_001.fastq  
SUPERIOR15 RAR15_S154_L001_R1_001.fastq RAR15_S154_L001_R2_001.fastq  
SUPERIOR30 RAR30_S166_L001_R1_001.fastq RAR30_S166_L001_R2_001.fastq
```

^m Donde las etiquetas se componen del punto y día de muestreo, donde, “SUPERIOR”, “MEDIO” e “INFERIOR”, indican a que estrato del RHALE corresponden los paquetes de secuencias, consecuentemente la etiqueta “UASB” hace referencia a los paquetes de secuencias correspondientes al lecho de lodo anaerobio del UASB. Del mismo modo “01”, “15” y “30” indican que las muestras fueron tomadas durante los días 01, 15 y 30 de este estudio, respectivamente.

MEDIO01 REM01_S178_L001_R1_001.fastq REM01_S178_L001_R2_001.fastq
MEDIO15 REM15_S190_L001_R1_001.fastq REM15_S190_L001_R2_001.fastq
MEDIO30 REM30_S152_L001_R1_001.fastq REM30_S152_L001_R2_001.fastq
MEDIO01 LIX01_S164_L001_R1_001.fastq LIX01_S164_L001_R2_001.fastq
MEDIO15 LIX15_S176_L001_R1_001.fastq LIX15_S176_L001_R2_001.fastq
MEDIO30 LIX30_S188_L001_R1_001.fastq LIX30_S188_L001_R2_001.fastq
UASB01 UAS01_S106_L001_R1_001.fastq UAS01_S106_L001_R2_001.fastq
UASB15 UAS15_S118_L001_R1_001.fastq UAS15_S118_L001_R2_001.fastq
UASB30 UAS30_S130_L001_R1_001.fastq UAS30_S130_L001_R2_001.fastq

Y para el análisis de secuencias de arqueas:

SUPERIOR15 RAR15_S177_L001_R1_001.fastq RAR15_S177_L001_R2_001.fastq
SUPERIOR30 RAR30_S189_L001_R1_001.fastq RAR30_S189_L001_R2_001.fastq
UASB01 UAS01_S141_L001_R1_001.fastq UAS01_S141_L001_R2_001.fastq
UASB15 UAS15_S153_L001_R1_001.fastq UAS15_S153_L001_R2_001.fastq
UASB30 UAS30_S165_L001_R1_001.fastq UAS30_S165_L001_R2_001.fastq

2. Se ingresó al servidor desde el entorno gráfico de Ubuntu, como en el paso 1.1, y se copiaron los archivos stability.files en las carpetas de trabajo, de manera correspondiente.

1.3 Base de datos de referencia.

1. Se siguieron las instrucciones del MiSeq SOP -Mothur para descargar la base de datos "SILVA" y el archivo de referencia "Trainset9_032012.pds".
2. Se ingresó al servidor desde el entorno gráfico de Ubuntu, como en el paso 1.1, y se copiaron los archivos en las carpetas de trabajo.
3. Se ingresó al servidor desde la terminal como en el paso 1.1 y se descomprimieron los archivos.zip con el comando:

unzip archivo.zip

2. Análisis bioinformático con Mothur

1. Se conectó al servidor desde la terminal y se ingresó a la carpeta de trabajo como se indica en el paso 1.1

2. Se llamó al programa Mothur con el comando

mothur

3. Se crearon secuencias contiguas a partir de las secuencias *forward* y *reverse* de los paquetes de secuencias utilizando 80 procesadoresⁿ del servidor con el comando:

make.contigs(file=stability.files, processors=80)

4. Se revisaron las características de los contigs con el comando:

summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.fasta)

5. Se eliminaron las secuencias cuyo tamaño era menor a 435 bases y mayor a 445 bases, de la misma manera aquellas con bases ambiguas y con secuencias homopoliméricas de tamaño mayor a 8 bases con el comando:

screen.seqs(fasta=stability.trim.contigs.fasta, group=stability.contigs.groups, maxambig=0, maxlength=445, minlength=435, maxhomop=8)

6. Se revisaron las características de las secuencias no eliminados con el comando:

summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.fasta)

ⁿ Desde que se ingresa un comando en el que se le indique a Mothur trabajar con cierto número de procesadores, Mothur utiliza ese número de procesadores en los comandos siguientes.

7. Considerando que debía haber secuencias idénticas, y con la finalidad de agilizar el trabajo en los pasos posteriores, se creó un paquete de secuencias únicas, con el siguiente comando:

```
unique.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.fasta)
```

8. Se creó un archivo en el que la primer columna es el nombre del grupo de secuencias únicas y la segunda es el número de veces que se repiten esas secuencias, con el comando:

```
count.seqs(name=stability.trim.contigs.good.names,  
group=stability.contigs.good.groups)
```

9. Se revisaron las características de las secuencias únicas con el comando:

```
summary.seqs(count=stability.trim.contigs.good.count_table)
```

10. Se alinearon las secuencias únicas con las de la base de datos silva (descargada anteriormente) con el comando:

```
align.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.fasta,  
reference=silva.bacteria/silva.bacteria.fasta)
```

11. Se analizaron las características de alineamiento con el comando:

```
summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.align,  
count=stability.trim.contigs.good.count_table)
```

12. Se eliminaron aquellas secuencias cuyo alineamiento iniciara en una posición más adelante que las posiciones reportadas y aquellas cuyo alineamiento terminara en una posición anterior a las posiciones reportadas con el comando:

```
screen.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.align,  
count=stability.trim.contigs.good.count_table,
```

```
summary=stability.trim.contigs.good.unique.summary, start=31145, end=42546)
```

13. Considerando que las secuencias analizadas que tenían una longitud promedio de 438 bases, fueron alineadas contrastándolas contra una base de datos en la que las secuencias tenían 50,000 caracteres, se eliminaron las columnas de alineamiento que sólo contenían gaps (-) producidas por alineamiento, con el comando:

```
filter.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.align, vertical=T, trump=.)
```

14. Se analizaron las características de las secuencias con el siguiente comando:

```
summary.seqs(fasta=current, count=current)
```

15. Tomando en cuenta que varias secuencias fueron eliminadas durante el proceso se volvió a generar un archivo de secuencias únicas con el comando:

```
unique.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.fasta, count=stability.trim.contigs.good.good.count_table)
```

16. Se agruparon aquellas secuencias que contenían máximo 4 bases diferentes entre sí con el comando:

```
pre.cluster(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.fasta, count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.count_table, diffs=4)
```

17. Se analizó el paquete de secuencias para identificar secuencias quiméricas con el comando:

```
chimera.uchime(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta, count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.count_table, dereplicate=t)
```


18. Se removieron las secuencias químicas de paquete de secuencias con el comando:

```
remove_seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta,
accnos=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.accnos)
```

19. Se clasificaron las secuencias a los niveles taxonómicos de Género, Familia, Orden, Clase, *Phyla* y Dominio con un nivel de similitud mayor a 80%, con el comando :

```
classify_seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.count_table,
reference=trainset9_032012.pds.fasta,
taxonomy=trainset9_032012.pds.tax, cutoff=80)
```

20. Se eliminaron aquellas secuencias clasificadas como pertenecientes a eucariotas y arqueas, y a las “no clasificadas” a nivel taxonómico de dominio con el comando:

```
remove_lineage(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.count_table,
taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.taxonomy, taxon=unknown-Eukaryota-Archaea)
```

21. Se analizaron las características de las secuencias con el comando:

```
summary_seqs(fasta=current, count=current)
```

22. Se clasificaron las secuencias en filotipos con el comando.

```
phylotype(taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.taxonomy)
```

23. Para analizar la diversidad en los grupos a nivel taxonómico se creó una tabla en la que se muestra el número de secuencias contabilizados para cada género caracterizado en las muestras, con el comando:

```
make.shared(list=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.list,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.pick.count_table, label=1)
```

25. Se clasificaron todas las secuencias a nivel de género con el comando:

```
classify.otu(list=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.list,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.pick.count_table,
taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.taxonomy, label=1)
```

26. Se contó cuantas secuencias había para cada grupo con el comando:

```
count.groups(shared=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.shared)
```

27. Se calcularon las curvas de rarefacción con el comando:

```
rarefaction.single(shared=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.shared, calc=sobs, freq=100)
```

28. Se calcularon los índices de diversidad de Chao, Shannon y Simpson, tomando 14, 794 secuencias al azar (que corresponden al número total de secuencias del grupo que tiene menos) con el comando:

```
summary.single(shared=stability.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.shared,
calc=nseqs-chao-shannon-simpson,
subsample=14794)
```



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO



No. 00249

Matrícula: 2153804205

ANÁLISIS METATAXONÓMICO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 29 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. LUIS RAUL TOVAR GALVEZ
- DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO
- DRA. MARIA EUGENIA DE LA TORRE HERNANDEZ
- DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

YOVANY CUETERO MARTINEZ
ALUMNO

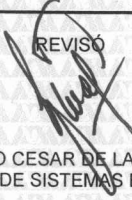
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: YOVANY CUETERO MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

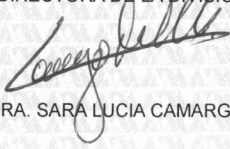


REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

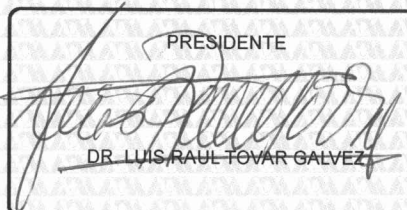
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



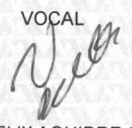
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRÉSIDENTE



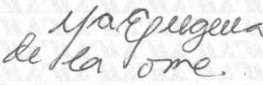
DR. LUIS RAUL TOVAR GALVEZ

VOCAL



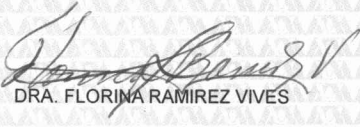
DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO

VOCAL



DRA. MARIA EUGENIA DE LA TORRE HERNANDEZ

SECRETARIA



DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES