

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO SECUNDARIO PARA EL
SANEAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES A NIVEL DE
BIORREACTOR CON UN CONSORCIO MICROBIANO Y EL USO
DE BIOMASA OBTENIDA COMO SUPLEMENTO EN LA
ALIMENTACIÓN DE GANADO**

Por

M.C. Juan Manuel Ballesteros Torres

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Julio 2020

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO SECUNDARIO PARA EL SANEAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES A NIVEL DE BIORREACTOR CON UN CONSORCIO
MICROBIANO Y EL USO DE BIOMASA OBTENIDA COMO SUPLEMENTO EN
LA ALIMENTACIÓN DE GANADO**

Comité de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Vocal 1

Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Vocal 2

Dr. José Alberto Valadez Lira
Vocal 3

Dr. Luis Samaniego Moreno
Director Externo

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO SECUNDARIO PARA EL SANEAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES A NIVEL DE BIORREACTOR CON UN CONSORCIO
MICROBIANO Y EL USO DE BIOMASA OBTENIDA COMO SUPLEMENTO EN
LA ALIMENTACIÓN DE GANADO**

Dirección de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Luis Samaniego Moreno
Director Externo

Agradecimientos

- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización del presente proyecto.
- Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por haberme dejado desarrollar mis competencias y habilidades profesionales.
- Agradezco de todo corazón a la Dra Patricia Tamez Guerra por su apoyo incondicional y por haber depositado en mí, la confianza para el desarrollo de este proyecto.
- Agradezco al Dr Luis Samaniego Moreno por haberme dado la confianza desde el inicio y sin haber una relación previa de trabajo, por su apoyo, por todas las puertas que me abrió y por haberme dejado formar parte del Departamento de Riego y Drenaje de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Agradezco profundamente al personal del Departamento de Riego y Drenaje, al Dr. Fernando Villarreal por brindarme su amistad, al Dr. Sergio Garza por el espacio y la confianza, al Dr. Alejandro Zermeño por sus consejos y pláticas vespertinas, a las laboratoristas Silvia y Socorrito quienes fueron unas maestras fundamentales para la realización de mi tesis, y para “Vicky” y sus amenas y muy positivas pláticas. Muchas gracias por su apoyo y amistad.
- A mis buenos amigos de la Facultad, Enrique, Nora, Adán, Laiju, Queta y todos aquellos que he tenido la fortuna de conocer durante este trayecto.
- Y por último, a mis padres, Juan Manuel y Ana Bertha; a mis hermanas Estrella y Ana, que sin ellos nunca hubiera podido lograr todos los objetivos que me he puesto. Su apoyo incondicional en el momento adecuado, sus regaños, sus llamadas de atención, sus felicitaciones y sobre todo, su ánimo y confianza cuando las cosas se tornaban más complicadas, disipando todos aquellos temores e inseguridades que en mi vida han surgido. Gracias por ser parte de mi vida y de toda esta cotidaneidad.

Índice	pág
Resumen	11
1. Introducción	13
2. Antecedentes	15
2.1 Tratamiento de aguas residuales	15
2.2 Microalgas y <i>Chlorella</i> sp. en el tratamiento de aguas	18
2.3 Aplicación de microalgas y microorganismos heterótrofos para el tratamiento de aguas residuales.	21
2.4 Metagenómica de comunidades microbianas en el tratamiento de aguas	24
2.5 Subproductos de las microalgas posterior al tratamiento de aguas y su utilización en la alimentación animal	27
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivo general	32
5.1 Objetivos particulares	32
6. Metodología	33
6.1 Identificación de la comunidad microbiana por metagenómica	33
6.2 Actividad remediadora de las cepas evaluadas de manera individual	35
6.3 Determinación de grasas y proteínas en la biomasa de microalgas obtenidas del tratamiento individual de aguas.	37
6.4 Evaluación de la actividad remediadora de los consorcios microbianos.....	39
6.5 Bioensayo del potencial nutricional de la biomasa resultante.	40
7. Resultados	42
7.1 Análisis de poblaciones microbianas	42
7.2 Análisis de actividad metabólica y de componentes celulares a través del cálculo del índice de finalización de módulos (IFM)	46
7.3 Actividad remediadora de las cepas evaluadas de manera individual	76
7.4 Cuantificación de grasas totales y proteínas	78
7.5 Cuantificación de proteínas	81
7.6 Actividad remediadora de los consorcios microbianos	83
7.7 Biomasa microbiana como suplemento alimenticio en cabras Sannen (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	91
9. Conclusiones	112
Bibliografía	114
Resumen bibliográfico	133

ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	página
Tabla 1. Especies y códigos resultantes del análisis del índice de finalización de módulos (IFM), a partir del evaluador de potencial metabólico y fisiológico del genoma (MAPLE, en inglés).	45
Tabla 2. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros bioquímicos del agua como producto de la actividad de biorremediación	75
Tabla 3. Concentración de proteínas de <i>Chlorella sorokiniana</i> calculada con la ecuación $y = 0.0002e^{10.411x}$	79
Tabla 4. Concentración de proteínas de <i>Chlorella vulgaris</i> calculada con la ecuación $y = 0.0002e^{10.411x}$	79
Tabla 5. Combinación de tratamientos y definición de las diferencias estadísticas entre ellos (conductividad).	87
Tabla 6. Química sanguínea realizada en cabras Saanen (<i>Capra aegagrus hircus</i>).	88
Tabla 7. Valores de referencia de referencia de los parámetros bioquímicos analizados en cabras Saanen (<i>Capra aegagrus hircus</i>).	99
Tabla 8. Evaluación del peso de las cabras Saanen (<i>Capra aegagrus hircus</i>) durante el tiempo del bioensayo.	89
Tabla 9. Porcentajes de grasas totales obtenidos por el método soxhlet, a partir de la biomasa generada del proceso continuo de tratamiento de aguas por 12 semanas.	90
Tabla 10. Porcentajes de proteína total obtenidos por el método Kjeldahl, a partir de la biomasa generada del proceso continuo de tratamiento de aguas por 12 semanas.	90

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Número de Figura	página
Figura 1. Ubicación del punto de muestreo del arroyo “La encantada”, ubicado en la calle Canoas, colonia Valle verde 2do sector, Saltillo, Coahuila. (25.479588, -100.997375).	31
Figura 2. Relación entre el porcentaje de abundancia y las especies bacterianas identificadas por secuenciación masiva en la plataforma Illumina a partir de las secuencias amplificadas con el uso de los cebadores 16s. (file:///E:/Seminario%20final/PT1MA4SS01_16s.html).	41
Figura 3. Relación entre el porcentaje de abundancia y las especies eucariotas identificadas por secuenciación masiva en la plataforma Illumina a partir de las secuencias amplificadas con el uso de los cebadores 18s. (file:///E:/Seminario%20final/PT1MA4SS02.18S.html).	42
Figura 4. Relación entre el porcentaje de abundancia y las especies de hongos identificadas por secuenciación masiva en la plataforma Illumina a partir de las secuencias amplificadas con el uso de los cebadores ITS. (file:///E:/Seminario%20final/PT1MA4SS03.ITS.html).	43
Gráfica 1. Relación de biomasa de microalgas producida por mililitro. Las letras indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación	76
Gráfica 2. Rendimiento de biomasa con relación al volumen total de agua tratada. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación	77
Gráfica 3. Determinación de la concentración de grasas y aceites en el agua residual tratada, a nivel matraz. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación.	78
Gráfica 4. Determinación de la concentración de proteínas. La concentración se determinó por medio de la ecuación logarítmica de la línea de tendencia de la curva estándar. A= Agitación; C neg= control negativo; C.s.= <i>Chlorella sorokiniana</i> ; C.v.= <i>Chlorella vulgaris</i> ; L= Luz.	79
Gráfica 5. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de pH entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= <i>Bacillus subtilis</i> ; C.s.= <i>Chlorella sorokiniana</i> ; C.v.= <i>Chlorella vulgaris</i> ; P. sp.= <i>Penicillium</i> sp.	81
Gráfica 6. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de turbidez entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= <i>Bacillus subtilis</i> ; C.s.= <i>Chlorella sorokiniana</i> ; C.v.= <i>Chlorella vulgaris</i> ; P. sp.= <i>Penicillium</i> sp.	81
Gráfica 7. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de OD entre tratamientos. A= Agitación; L=	82

- Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.*
- Gráfica 8. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la DQO entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.* **83**
- Gráfica 9. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la DBO₅ entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.* **84**
- Gráfica 10. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la materia orgánica entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.* **84**
- Gráfica 11. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de nitrógeno entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.* **85**
- Gráfica 12. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de conductividad entre tratamientos. = Agitación; L= Luz; C neg= control negativo; B.s.= *Bacillus subtilis*; C.s.= *Chlorella sorokiniana*; C.v.= *Chlorella vulgaris*; P. sp.= *Penicillium sp.* **86**

ÍNDICE DE MAPAS DE CALOR

Número de mapas de calor	página
Mapa 1. Mapa de calor de las vías metabólicas del metabolismo energético de carbohidratos.	46
Mapa 2. Mapa de calor de las vías metabólicas del de la fijación de carbono.	47
Mapa 3. Mapa de calor de las vías metabólicas del nitrógeno.	48
Mapa 4. Mapa de calor de las vías metabólicas del azufre.	49
Mapa 5. Mapa de calor de las vías metabólicas de la síntesis de ácidos grasos.	49
Mapa 6. Mapa de calor de las vías metabólicas de los lípidos.	50
Mapa 7. Mapa de calor de las vías metabólicas de las purinas.	51
Mapa 8. Mapa de calor de las vías metabólicas de las pirimidinas.	51
Mapa 9. Mapa de calor de las vías metabólicas de serina y treonina.	52
Mapa 10. Mapa de calor de las vías metabólicas de cisteína y metionina.	53
Mapa 11. Mapa de calor de las vías metabólicas de aminoácidos con cadena ramificada.	53
Mapa 12. Mapa de calor de las vías metabólicas de lisina.	54
Mapa 13. Mapa de calor de las vías metabólicas de arginina y prolina.	55
Mapa 14. Mapa de calor de las vías metabólicas de histidina.	55
Mapa 15. Mapa de calor de las vías metabólicas de los aminoácidos aromáticos.	56
Mapa 16. Mapa de calor de las vías metabólicas de las vitaminas y cofactores.	58
Mapa 17. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la fotosíntesis.	59
Mapa 18. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ATP.	61
Mapa 19. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ADN.	62
Mapa 20. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la replicación de ADN.	63
Mapa 21. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la reparación de ADN.	63
Mapa 22. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ARN.	64
Mapa 23. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del procesamiento y maduración de ARN.	64
Mapa 24. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la actividad ribosomal.	65
Mapa 25. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la degradación de proteínas.	65
Mapa 26. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del sistema de señalamiento molecular por ubiquitinación.	66
Mapa 27. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de transporte de iones minerales y orgánicos.	68
Mapa 28. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de transporte de sacáridos, poliíoles y lípidos.	70
Mapa 29. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de transporte de fosfato y aminoácidos.	71
Mapa 30. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de transporte de iones metálicos, sideróforos de Fe y vitamina B12.	72

Resumen

La problemática para la descontaminación de agua plantea la implementación de diversas tecnologías. Se ha reportado que, gracias al metabolismo, los consorcios microbianos entre microalgas y microorganismos heterótrofos ayudan a la remoción de nutrientes y contaminantes. Nuestro objetivo fue lograr descontaminar efluentes por medio de consorcios microbianos y determinar el valor nutrimental de la biomasa obtenida como suplemento alimenticio en cabras para evaluar el efecto de esta en el peso y en sus parámetros sanguíneos. Para lograrlo, se evaluó la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *C. sorokiniana*, *Penicillium* sp y *Bacillus subtilis* para la descontaminación de agua, tanto de manera individual como en combinación, bajo diferentes condiciones de cultivo. Se evaluó el rendimiento de biomasa, la producción de proteínas y el comportamiento de estas combinaciones en el tratamiento de aguas residuales procedentes del arroyo “La encantada”. Se analizó la comunidad microbiana formada usando metagenómica, para elucidar los posibles mecanismos metabólicos implicados en la descontaminación, contrastando con los parámetros estipulados en las normativas mexicanas que determinan la calidad del agua. La biomasa obtenida se aplicó como suplemento alimenticio en cabras Sannen. En orden de abundancia descendente, se detectaron bacterias de los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Cianobacteria y Firmicutes; hongos pertenecientes a los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota; eucariotes como ciliados, metazoarios, plantas y microalgas, entre otros. A nivel matraz, *C. vulgaris* mostró la mayor actividad descontaminante ($p < 0.05$), mientras que *C. sorokiniana* bajo luz y agitación mostró el mayor rendimiento de biomasa (20.5 mg/mL) ($p < 0.05$). La mayor remoción de grasas se presentó con *C. sorokiniana* bajo luz y agitación (191.5 mg/mL) y con luz (190.5 mg/mL), comparado con en el control sin inocular (400 mg/mL) ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en la producción de proteínas. Al escalar el proceso, las combinaciones de *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. y *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. con luz, lograron la mayor remoción de sales ($p < 0.05$), comparado con *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. con luz. El mayor incremento de peso de cabras suplementadas se observó con *C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz (4.5 kg). En conclusión, *C. vulgaris* presentó mayor eficacia para la descontaminación y *C. sorokiniana* en la producción de biomasa, donde ambas se pueden usar como suplementos alimenticios en rumiantes pequeños.

Summary

The water decontamination problem raises for various technologies implementation. It has been reported that, microbial consortia between microalgae and heterotrophic microorganisms-metabolism help the nutrients and contaminants removal. Our objective was to decontaminate effluents through microbial consortia and determine the biomass obtained nutritional value as food supplement in goats, upon weight and blood parameters. To achieve this, the *Chlorella vulgaris* and *C. sorokiniana*, *Penicillium* sp. and *Bacillus subtilis* ability for water decontamination was evaluated, both individually and in combination, under different cultivation conditions. The biomass yield, the protein production and these combinations behavior in the wastewater treatment from "La Encadada" stream were evaluated. The microbial community formed was analyzed using metagenomics to elucidate the possible metabolic mechanisms involved in decontamination, contrasting with the parameters stipulated in Mexican regulations that determine water quality. The biomass obtained was supplemented to Sannen goats along with conventional food. In descending order of abundance, bacteria from the Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria and Firmicutes phyla were detected; fungi belonging to the Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota and Zygomycota phyla; and eukaryotes such as ciliates, metazoans, plants and microalgae, among others. At the flask level, *C. vulgaris* showed the highest decontaminating activity ($p < 0.05$), while *C. sorokiniana* under light and shaking showed the highest biomass yield (20.5 mg/mL) ($p < 0.05$). The highest grease removal occurred with *C. sorokiniana* under light and shaking (191.5 mg/mL) and with light (190.5 mg/mL), compared with the uninoculated control (400 mg/mL) ($p < 0.05$). No significant differences were observed in protein production. After scaling the process, the *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. and *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. combinations with light achieved the highest salts removal ($p < 0.05$), compared to *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. with light. The greatest increase in weight of supplemented goats was observed with *C. vulgaris* + *B. subtilis* with light (4.5 kg). In conclusion, *C. vulgaris* showed higher efficacy for decontamination and *C. sorokiniana* for biomass production, where both can be used in small ruminants as food supplements.

1. Introducción

La recuperación del agua mediante los procesos de tratamiento de aguas residuales ha sido un proceso ampliamente estudiado con el propósito de optimizar dicho procedimiento, logrando alcanzar distintas metas: i) la recuperación y reutilización de agua contaminada; ii) remoción de sustancias contaminantes y de riesgo para el ambiente y el ser humano y iii) eliminar los patógenos presentes en el agua residual, volviendo el agua menos riesgosa para su reutilización (Ramalho *et al.*, 1990). Para lo anterior se han estudiado diversos métodos biotecnológicos que logran los fines antes mencionados, además de generar subproductos de interés en diversas industrias, tales como farmacéuticas, bioenergéticas, alimenticias, entre otras (Paniagua-Michel *et al.*, 2015). El uso de un consorcio microbiano compuesto por microalgas y microorganismos heterótrofos ha demostrado ser favorable en diferentes aspectos:

- i) hay una reducción de energía y de costos al eliminar la aplicación de oxígeno exógeno,
- ii) la acción autótrofa de las algas se conjunta con la acción heterótrofa de las bacterias, potenciando la remoción de nutrientes y contaminantes, y
- iii) el diseño de estos bioprocesos puede generar la producción de moléculas de interés (ácidos grasos poliinsaturados y proteínas) como subproductos, usadas en la industria alimenticia o direccionarse a la producción de biocombustibles y bioenergía (Chiu *et al.*, 2015), reportándose en estudios anteriores microalgas de los géneros *Chlorella* (clorofita).

El análisis de la comunidad de microorganismos mediante estudios de metagenómica, se puede enfocar hacia la identificación de los integrantes cominidades microbianas mediante el análisis de regiones genéticas conservadas y/o el análisis de genes funcionales que describan la actividad enzimática y metabólica de los mismos; lo anterior refiriéndose a organismos no cultivables y que se pueden analizar a partir de muestras obtenidas de forma directa del ambiente (Handelsman *et al.*, 1998; Daniel, 2004), permitiendo elucidar su funcionalidad en la comunidad microbiana, en este particular caso, que buscará remediar el agua contaminada. Por otra parte, se ha observado que el uso de microalgas para la

alimentación no es nuevo, ya que se han presentado efectos positivos como consecuencia de su uso en rumiantes, tales como ganancia de peso, aprovechamiento de ácidos grasos poliinsaturados, potenciación del metabolismo, entre otros (Altomonte *et al.*, 2018; Dineshababu *et al.*, 2019). En el presente proyecto se planteó el uso de microorganismos heterótrofos y autótrofos, de manera individual y en combinación, para tratar el agua residual, dentro de un proceso secundario de tratamiento de aguas donde la optimización de los fotoperíodos aplicados permitirá, a su vez, obtener biomasa con potencial uso como suplemento alimenticio en cabras de la raza Saanen.

2. Antecedentes

2.1 Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de agua es un proceso que permite restaurar la calidad e inocuidad del agua a un nivel permisible para ser incorporada al ambiente, de esta forma las características inseguras se reducen impactando el ambiente en menor medida y aminorando el riesgo epidemiológico para el ser humano y demás seres vivos. Un amplio rango de actividades y métodos para el tratamiento de aguas residuales están bien establecidos en gran número de países desarrollados (Chen *et al.*, 2019b). Entre los métodos más utilizados están los lodos activados, sistema de tanques estabilizados, tanques sépticos, sistemas anaerobios, filtros percoladores, sistemas de aplicación de tierra, entre otros; siendo los tanques estabilizados los más utilizados debido a su bajo costo y a una mayor facilidad de instalación y mantenimiento presentándose durante el proceso una disminución significativa en los niveles de oxígeno biológico, nitrógeno, fósforo; y la reducción en los indicadores microbianos (Wang *et al.*, 2019). El propósito principal de estos procesos es la eliminación de contaminantes teniendo como objetivo la reducción de enfermedades transmitidas por agua y el control de patógenos presentes en la misma, volviéndola óptima para su reutilización (Delgado-Gardea *et al.*, 2019).

Las aguas residuales se clasifican en municipal, agrícola, e industrial, dependiendo de su origen y componentes que poseen. Los tres tipos de agua residual se han utilizado como sustrato para microalgas, logrando de manera exitosa la remoción de nutrientes y contaminantes de ellas. Las características principales del agua residual municipal son definidas por los contaminantes emitidos por la acción doméstica. Los contaminantes varían entre una locación y otra; sin embargo, poseen materia orgánica, nutrientes, microorganismos y residuos químicos usados en el hogar (Ramalho *et al.*, 1990). El cultivo de microalgas ha sido muy estudiado utilizando este tipo de aguas residuales, buscando el tratamiento de estas aguas residuales (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). El agua residual agrícola incluye desechos como estiércol de ganado y restos vegetales; siendo los restos de ganado la mayor fuente de desechos vertidos al agua. Estas aguas se caracterizan por poseer nitrógeno y fósforo, en su forma orgánica como principales componentes; sin embargo, las cantidades de nutrientes son

determinadas por la intensidad de las diferentes actividades realizadas tanto en la agricultura como en la ganadería (de Godos *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010b). El agua residual industrial posee distintos componentes, esto con relación a las diferentes fuentes de contaminantes emitidos por los distintos tipos de industrias. En este tipo de aguas residuales hay presencia de nitrógeno y fósforo, también están incluidos los metales pesados. Las cantidades de agua utilizada, el flujo de producción y el desarrollo de tecnologías de reciclamiento de agua son determinantes para definir las cantidades de contaminantes presentes en este tipo de aguas. Por otra parte, la complejidad de estas aguas se presenta con relación a sus componentes, factor importante para la selección y acondicionamiento de microalgas con el fin de optimizar su capacidad para remover contaminantes, nutrientes y para producir sustancias de interés industrial (Ahluwalia y Goyal, 2007)

El proceso general de tratamiento de aguas se divide en las fases 1) Primaria: remoción de residuos sólidos, 2) secundaria: suspensión, disolución y remoción de materia orgánica mediante procesos físicos, químicos y biológicos y 3) terciaria: desinfección y filtración, donde el agua resultante (efluente) es preformada para ser reincorporada al ambiente (Ramalho, 1977), teniendo como finalidad reducir los riesgos de las aguas contaminadas por acción del hombre. Un ejemplo de proceso de tratamiento de aguas lo describen Ramalho *et al.* (1990) de la siguiente manera:

1. Etapas de pretratamiento: el objetivo principal de esta etapa es retirar los contaminantes de mayor tamaño, como bolsas, botellas y basura en general. Al eliminar los residuos de mayor tamaño se evita el riesgo de alguna descompostura en las máquinas y procesos posteriores. Este proceso se realiza mediante dos procedimientos: a) tamizaje grueso y b) desarenador.

a) Tamizaje grueso: se utiliza con el fin de separar cuerpos flotantes, evitando que en procesos posteriores se obstruyan los conductos, se formen depósitos de estos, incrementar la eficiencia de los procesos posteriores, no dañar alguna maquinaria.

b) Desarenador: cuando no se separa la arena el proceso se ve afectado de distintas maneras. Incrementa la densidad del fango, pegándose en paredes y dificultando su tránsito; taponamiento de tuberías y canales. Separa principalmente arenas, arcillas y limo, entre otros.

2. Reactor biológico: Conocido también como tratamiento secundario. Es un área donde el conjunto de microorganismos y la materia orgánica presente en el agua residual interactúan

de manera que dicha población microbiana metaboliza la materia orgánica reduciendo su cantidad en el agua, para posteriormente separarla en un proceso de sedimentación. La formación de ese sedimento, conocido como lodo activado, se compone de materia biológica (microorganismos y algunos organismos pluricelulares pequeños) y materia orgánica e inorgánica, componentes que participan en un bioproceso aeróbico. Cuando la materia orgánica procedente del agua residual es degradada, la mezcla (licor mezclado) pasa a un tanque de sedimentación donde los lodos activados pueden reutilizarse para mantener la concentración microbiana en el biorreactor; o desecharse las cantidades sobrantes.

3. Tanque sedimentador: este proceso se realiza con la finalidad de separar los lodos activados del agua tratada, de manera que el agua separada se encuentra clarificada debido a la separación de los lodos y a la previa remoción de materia orgánica. El flujo del agua es lento, lo que permite la sedimentación de las partículas. A mayor tiempo de retención, mayor cantidad de partículas sedimentadas. Parte de estos sedimentos son reutilizados en el reactor biológico y otras son eliminadas.

4. Proceso de cloración: en esta etapa del proceso se aplica una dosis de cloro gas para eliminar los posibles patógenos presentes en el agua, de manera que, en su reincorporación, no sean un riesgo latente para la transmisión de enfermedades infecciosas.

5. Espesado y deshidratado de lodos: en esta etapa se pretende reducir el volumen de los lodos retirando la mayor cantidad de agua posible. El espesado, como primer paso, se logra en un tanque de sedimentación, donde los lodos se espesan por gravedad. El deshidratado puede ser por distintos métodos:

- i) deshidratación mecánica,
- ii) adición de arena o pavimento, y
- iii) congelado de lodos, entre otros.

Es importante entender que la normativa se dirige a dos aspectos:

- a) calidad de agua y
- b) límites de vertidos.

Sin embargo, no existe una limitación en el vertido de contaminantes, de manera que, a pesar de realizar procesos de tratamiento similares, una empresa de mayor tamaño contaminará más que una de menor tamaño; donde esta discrepancia también incluye la

relación aporte económico- recursos utilizados. Se toman en cuenta que entre los parámetros a determinar están las demandas química y bioquímica de oxígeno, color, turbidez, pH, olor, temperatura, sólidos totales, entre otros (Ramalho *et al.*, 1990; Robledo-Zacarías *et al.*, 2017).

Es de vital importancia generar métodos que permitan la optimización del proceso de tratamiento de aguas, ya que la reducción de microorganismos patógenos presentes en el agua se vuelve un punto muy favorable para establecer la inocuidad del agua y preservar la salud de la población. Al optimizar los procesos de tratamiento de agua se han presentado reducciones en los indicadores microbianos de hasta un 99% (Shuval *et al.*, 1986; von Sperling, 2007).

2.2 Microalgas y Chlorella sp. en el tratamiento de aguas

Las microalgas juegan un papel importante en distintos procesos de degradación de componentes en aguas residuales de pequeña, mediana y gran escala, además de producir el 50% del oxígeno total producto de la fotosíntesis (Chiu *et al.*, 2015). Se ha reportado que la utilización de microalgas ha sido exitosa para la remoción de nutrientes, metales pesados, patógenos, entre otros (Muñoz y Guieysse, 2006), Aunado a esto, proporciona mayor rendimiento de biomasa que las plantas de cosecha, esto en términos de área de suelo utilizado; reduciendo de forma considerable los costos y el impacto ambiental provocado por los procesos de cosecha (Chiu *et al.*, 2015). La ecología generada en los reactores usados en el tratamiento de agua es de importancia considerable para la utilización de microalgas con potencial uso para tratar las aguas residuales. Durante la generación de lodos activados generados mediante la concentración de materia orgánica mediante centrifugación y precipitación, se obtiene gran cantidad de nutrientes primarios y nutrientes esenciales requeridos para el desarrollo de microorganismos, concentrando altas cantidades de nitrógeno, carbono, fósforo; y nutrientes minerales como potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre y manganeso; ideales y necesarios para la producción de biomasa y bioenergía (microalgas) y reducción de desechos en el tratamiento de aguas (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, se considera de vital importancia considerar diversos factores ambientales como la concentración de nutrientes, la intensidad y tiempo de

exposición a la luz, ciclos de luz- oscuridad, concentración de CO₂ externo que terminarán influyendo sobre la producción de biomasa, la remoción de nutrientes y la potencial generación de biocombustibles, esto observado en diversas especies de microalgas (Li *et al.*, 2011). La remoción de componentes inorgánicos como fósforo y nitrógeno es difícil en los procesos comunes de tratamiento de aguas residuales, por tanto, la utilización de microalgas se ha vuelto una alternativa novedosa ya que poseen la capacidad de asimilar ambos y utilizarlos en sus procesos de crecimiento. Sin embargo, la utilización de estos procesos tiene sus ventajas y desventajas. Como ventaja está la aportación de oxígeno exógeno lo que reduce costos de iniciación, el decremento de energía aplicada de forma exógena y la reducción de costos operacionales. Como desventajas están los requerimientos de espacios de tamaño considerable para el cultivo de microalgas, la radiación solar y la temperatura, los cuales son factores críticos para la fotosíntesis y desarrollo de estos organismos y por ende, para su acción metabólica y remoción (Chiu *et al.*, 2015). Otro de los procesos donde se ha reportado la utilización de microalgas es en la remoción de metales pesados, considerados como contaminantes peligrosos, esto con relación al efecto adverso que pudieran provocar sobre seres vivos que estuvieran en contacto con ellos. Se ha analizado el uso de estos microorganismos para la remoción de metales pesados encontrando reportes de rendimientos de hasta el 99% en la remediación de aguas contaminadas con estos componentes. Entre los mecanismos utilizados por las microalgas para la remoción de metales están la absorción física, intercambio iónico, reacciones redox, precipitación de superficie, transporte activo a través de membrana para ser utilizados como elementos traza, entre otros (Muñoz y Guieysse, 2006). Otros componentes comunes en las aguas contaminadas son los compuestos orgánicos, encontrando moléculas que han sido reportadas, removidas y asimiladas con éxito por microalgas. Existen diferentes estudios que demuestran la efectividad en la remoción de nitrofenol, aceite de oliva y gran diversidad de compuestos orgánicos usados en la industria del papel (Tarlan *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2002, 2003).

En otros trabajos de investigación se han realizado estudios con microalgas del género *Chlorella* para la remoción de contaminantes de aguas residuales municipales y la producción de biomasa. Anteriormente se han descrito a los organismos pertenecientes al género *Chlorella* como el modelo ideal, metabólicamente y fisiológicamente hablando, para la descripción de la vida, crecimiento y desarrollo de micro y macrófitos, de manera complementaria, la

facilidad de manipulación de estas cepas a nivel laboratorio, proporciona una vía biotecnológica para el uso de estas microalgas para diversos fines (Krienitz *et al.*, 2015). El género *Chlorella* forma parte de la clase *Chloreophyceae*, donde organismos pertenecientes a este género se caracterizan por ser unicelulares, globulares o en algunos casos ovoides, que se reproducen por autoesporogénesis, presentándose en su morfología y fisiología la falta de flagelos y fases sexuales; sin embargo, en el caso de *C. variabilis*, simbiote de *Paramecium bursaria*, se han identificado genes específicos del proceso de meiosis (Delgado-Gardea *et al.*, 2014; Blanc *et al.*, 2010). El uso de especies de *Chlorella* en el tratamiento de aguas, y su uso para producción de biomasa se ha reportado con anterioridad, incluyendo *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. fusca*, que, mediante diversas técnicas de cultivo, se han observado rendimientos significativos; teniendo en cuenta la importancia del contenido de biomoléculas de interés en dicha biomasa (Abinandan y Shanthakumar, 2015).

En estudios realizados por Cabanelas *et al.* (2013) observaron una producción de biomasa en un rango de 39-195 mg/L, utilizando aguas residuales municipales; reforzando lo antes mencionado. Es importante mencionar el uso de las aguas residuales y contaminadas como medio de cultivo, donde *C. sorokiniana* se ha utilizado para remediar y crecer en aguas municipales, y *C. vulgaris*, en aguas de la misma naturaleza y aguas industriales (Cai *et al.*, 2013). Por otra parte, en el proceso de espesamiento al utilizar lodos activados, se ha observado la capacidad de generación de biomasa de algas del género *Chlorella* en una concentración de 0.9 mg/L (Li *et al.*, 2011). *C. vulgaris* tiene la capacidad de remover nitrógenos y fósforo inorgánico con un 86% y 78% de efectividad, respectivamente (Lau *et al.*, 1996).

Las aguas residuales agrícolas también son utilizadas para el desarrollo de microalgas. El alto contenido de fósforo y nitrógeno procedente del estiércol del ganado proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de microalgas; esto en combinación con las condiciones solares y temperatura adecuada potencia las condiciones de desarrollo y fotosíntesis de las algas; sin embargo, el exceso de amonio presente en el estiércol de algunos animales puede ser un factor que comprometa la generación de biomasa. Se ha demostrado que el uso del agua residual de los chiqueros contiene ácidos grasos volátiles como ácido acético, propiónico y butírico, útiles como sustratos para el desarrollo de estos microorganismos, utilizándose como fuentes de carbono y a la vez como estabilizadores de

pH; lo anterior fue observado por Huo *et al.* (2012), al usar ácido acético como estabilizador de pH y usando agua residual diaria de chiqueros, logrando crecer biomasa de *C. zoefinginensis* con alto contenido de aceites. También las aguas residuales de origen industrial se consideran importantes para el cultivo de microalgas. Si bien no es un requisito, la presencia de metales pesados se ha observado en las aguas residuales industriales, sin embargo, las microalgas recurren a procesos intra y extracelulares para su asimilación y remoción.

Mediante el uso de diversos complejos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y otras peroxidasas), aunado a la acción de fitoquelatinas, se ha observado la remoción de mercurio, zinc, plata y cobre, metales que a su vez sirven como inductores de la producción de estas proteínas (Singh *et al.*, 2016).

A pesar de la capacidad de las microalgas para la remoción de nutrientes y metales pesados, se debe tener en cuenta que un exceso en las concentraciones de nutrientes (fósforo y nitrógeno, principalmente) puede desembocar en un proceso de eutroficación (llamado así en los ecosistemas), fenómeno que puede volverse adverso para el proceso de remediación. Las aguas residuales con concentraciones más bajas de estos nutrientes son las aguas residuales domésticas (15-90 mg/L de nitrógeno; 5-20 mg/L de fósforo); las aguas residuales producto de uso agrícola y del ganado poseen concentraciones de 185-3213 mg/L de nitrógeno y 30-978 mg/L de fósforo. Al presentarse situaciones de esta naturaleza se debe tomar en cuenta realizar diluciones previas para el cultivo de microalgas a nivel de laboratorio y biorreactor (Chiu, 2015).

2.3 Aplicación de microalgas y microorganismos heterótrofos para el tratamiento de aguas residuales.

La selección de consorcios integrados por microorganismos heterótrofos y microalgas es un método donde el aprovechamiento de un potencial simbiótico de estos puede beneficiar el proceso de remediación del agua, esto debido al intercambio de O₂/CO₂ entre heterótrofos y algas; sin embargo fenómenos de actividad detrimental, generación de metabolitos secundarios, termodinámica y temperatura de las reacciones biológicas, y la concentración

de oxígeno disuelto son factores que también participan en esta reacción simbiótica, y a su vez, factores importantes para la elección de microorganismos óptimos para este bioproceso.

Watanabe *et al.* (2005) reportaron una actividad sinérgica entre *C. sorokiniana*, *Microbacterium trichotecenolyticum* y *Acremonium* sp., donde la acción metabólica y fisiológica de los heterótrofos, desencadenó una promoción del crecimiento de la microalga, observándose bajo microscopía electrónica que la cepa fúngica se adhería a la superficie de la microalga. Estas asociaciones pueden desencadenar en procesos positivos entre las poblaciones que forman parte de la comunidad presente en el agua residual.

La asociación de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* con *Azospirillum brasilense* generan de 3.1 y 3.0×10^6 células/mL, respectivamente; superior a lo producido de manera individual (1.3 y 0.8×10^6 células/mL, respectivamente) (De-Bashan *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 2005).

Reforzando lo descrito con anterioridad, existen reportes de la asociación de microorganismos con microalgas para la asimilación de nutrientes y compuestos orgánicos de diversas índoles; donde *C. vulgaris* y *Rhodotorula glutinis* remueven de manera eficaz compuestos presentes en aguas residuales industriales; *C. minutissima*, conjunto con *E. coli*, consumen glucosa, glicerol y acetato, esto en comparación con las cepas utilizadas de manera individual (Cheirsilp *et al.*, 2011; Higgins y Vander-Gheynst, 2014). Se entiende que la promoción en el crecimiento de la microalga y la inducción de las rutas metabólicas que asimilan los nutrientes y contaminantes del medio es debido a la producción de fitohormonas, las cuales pueden ser producidas por hongos, bacterias, cianobacterias y fitoplancton (Hu *et al.*, 2019).

De manera complementaria a lo antes expuesto, se demostró que la asimilación y remoción bacteriana de diclorometano incrementó un 36% cuando se agregaron microalgas activas o metabolitos de ellas. También se ha observado que el metabolismo y crecimiento de microalgas se potencia debido a la liberación de promotores de crecimiento producto del crecimiento microbiano (Fukami *et al.*, 1997; Gonzalez y Bashan, 2000). La aplicación de esta metodología ha resultado ser un método muy útil para la remoción de distintos contaminantes presentes en las aguas residuales, esto debido a que muchos contaminantes son degradados con mayor eficiencia de una forma aeróbica. La actividad conjunta de microalgas con otros organismos puede establecer una relación antagonista o sinérgica, según sea el caso, para la remoción de distintos contaminantes de aguas residuales. De-

Bashan *et al.* (2004) realizaron un estudio donde inmovilizaron, en camas de alginato, microalgas del género *C. vulgaris* de forma individual y *C. vulgaris* en conjunto con *A. brasilense* (cepa Cd), bacteria perteneciente al grupo de microorganismos promotores de crecimiento de plantas, observándose en este último caso una mayor remoción de nutrientes de fósforo y nitrógeno de las aguas residuales.

En específico en la remoción de sustancias que contienen nitrógeno, se ha observado que microalgas en conjunto con consorcios microbianos degradan los nutrientes nitrogenados a NH_4^+ o NO_3^- , observando que la liberación de amoníaco es menor en los procesos que incluyen fotosíntesis realizados por las microalgas, reduciendo el amoníaco de $0.74 \text{ mol mol}^{-1}$ (procesos no fotosintéticos) a $0.46 \text{ mol mol}^{-1}$ (procesos fotosintéticos) por molécula de acetonitrilo (Muñoz *et al.*, 2005a, b); lo anterior se ha observado y reportado a pesar que los nutrientes no son considerados como materiales peligrosos.

En otros estudios se encontró una acción sinérgica de *C. sorokiniana* y bacterias características de aguas residuales, degradando aeróbicamente fenantreno, acetonitrilo, fenol y salicilato sin ninguna adición de O_2 de forma exógena, esto al evaluar la actividad remediadora de aguas contaminadas con salicilato (*Ralstonia brasiliensis*), fenol (*Acinetobacter haemolyticus*) y fenantreno (*Pseudomonas migulae*), encontrando una actividad sinérgica, presentándose remoción de contaminantes por $> 85\%$ (Borde *et al.*, 2003). La combinación con cepas fúngicas también ha demostrado resultados prometedores con relación a la remediación del agua y al desarrollo de relaciones sinérgicas. Wrede *et al.* (2014) reportan una actividad sinérgica entre *Aspergillus fumigatus* y diversas microalgas, lo anterior en producción de biomasa, remediación de agua residual y producción de lípidos. Yang *et al.* (2019) reportaron la asociación entre *Chlorella* sp. y *Aspergillus* sp., donde el hongo influyó sobre la asimilación de contaminantes y sobre la potenciación en la producción de biomasa, al utilizar agua residual como medio de cultivo.

A pesar de los casos prometedores reportados con anterioridad para la remoción de nutrientes y contaminantes, es importante mencionar estudios que sugieren tener ciertas precauciones en su realización. El proceso de fotosíntesis de las microalgas se inhibe de manera significativa por la presencia de metales pesados en ciertas concentraciones (Clijsters y Vanassche, 1985). Los componentes orgánicos también han demostrado ser inhibidores, bajo ciertas condiciones de presión, de algas como *Pseudokirchneriella subcapitata*,

Daphnia magna y *Chlorella* spp., siendo esta última más resistente a cambios y a inhibición (Muñoz y Guieysse, 2006).

Otra condición que influye de manera negativa sobre las microalgas es la acción combinada de altas concentraciones de NH_3 y altos valores de pH, provocando que la presencia de NH_3 evite el seguimiento de la reacción de transporte de electrones y compite con el H_2O en las reacciones de oxidación que generan al final O_2 (Azov y Goldman, 1982). Muñoz (2005b) reportó un 100% de inhibición de la acción de *C. sorokiniana*, al presentarse una combinación de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ de 15 mM y valores de pH de 8.6, durante un tratamiento fotosintéticamente oxigenado de 2 g/L.

2.4 Metagenómica de comunidades microbianas en el tratamiento de aguas

Existen ambientes naturales que contienen gran cantidad de microorganismos, de los cuales muchos no han sido aislados y no son cultivables, por lo que se dificulta su análisis microbiológico o bioquímico. Solo del 0.1 al 1% de la población microbiana del suelo ha logrado ser cultivado en laboratorio, es por lo anterior que el desarrollo de la metagenómica ha cobrado gran relevancia proporcionando información sin la necesidad de tener el organismo aislado (Daniel, 2004). Las plantas de tratamiento de aguas están conformadas de sistemas biológicos complejos en los que se ven incluidos bacterias, hongos y protozoarios que participan de manera muy activa en la degradación de diversos componentes, fenómeno que sucede mediante la interacción compleja y cooperativa entre dichos organismos. El estudio de estas comunidades complejas mediante la metagenómica es una importante vía para la caracterización microbiana y la potencial identificación de especies y descubrimiento de nuevas vías metabólicas y los componentes que participan en ellas (Wexler *et al.*, 2005). Lo anterior llevó al diseño de metodologías que permitan el análisis metagenómico de una muestra ambiental. Se define como metagenoma a la colección de genomas de todos los microorganismos presentes en determinado ambiente (Handelsman *et al.*, 1998). La utilización de metagenómica lleva a la identificación de genes dentro de un ambiente, así como el análisis de las secuencias que codifican para sus funciones e interacciones. Ward *et al.*, (1990) realizaron un estudio en el cual identificaron cientos de miles de microorganismos no cultivables mediante la secuenciación de los genes que codifican para la subunidad

ribosomal 16s. Estudios más recientes y de mayor amplitud han arrojado 1.2 millones de genes nuevos procedentes de 1800 especies distintas, de las cuales 148 son nuevas especies identificadas. Lo interesante de esto, es que gran número de los genes son reportados en base a su función; por lo que se han identificado genes que codifican para nuevos antibióticos, actividad biocatalítica, enzimas para degradación de xenobióticos, entre otros (Streit y Schmitz, 2004). Una estrategia generalmente usada es en la que se aíslan diferentes muestras de ADN y/o ARN del ambiente para posteriormente ser clonadas en vectores adecuados para pequeños y grandes insertos. Posteriormente se generaron librerías, producto de la transformación de hospederos, principalmente células de *E. coli*, a los que se introducirán los distintos vectores para determinar posteriormente las diferencias en los modos de expresión entre los distintos grupos taxonómicos y detectar aproximadamente el 40% de las actividades enzimáticas generadas a partir de la construcción de librerías genéticas (Simon y Daniel, 2011). Esta vía se sustenta en el análisis de secuencias basadas en la función de los genes, en otras palabras, es el análisis de genomas con relación a la actividad metabólica de clones que contienen las librerías metagenómicas. Mediante este método no es necesario conocer las secuencias de los genes a analizar, sino el comportamiento de los clones con relación a la actividad metabólica condicionada por los factores nutrimentales y ambientales a los que se someta la cepa que contenga el plásmido insertado. Se han aislado genes clonados en *E. coli* procedentes de muestras procedentes de materia fecal, encontrando genes que codifican para β -glucoronidasa (Gloux *et al.*, 2011). De forma similar, estudios realizados a partir de comunidades microbianas con capacidad de degradar celulosa, arrojaron como resultados diferentes clones con la capacidad de hidrolizar *p*-nitrofenil-D-glucopiranosido y *p*-nitrofenil-L-arabino-piranosido; obteniendo como resultado la obtención de dos nuevas glicosil-hidrolasas pertenecientes a una nueva familia de β -galactosidasas/ α -piranosidasas (Ferrer *et al.*, 2012). Esta estrategia, también, ha llevado a la identificación de nuevas clases de proteínas y enzimas, como dioxigenasas, nitrato reductasas, Fe-Fe hidrogenasas, quitinasas, glicerol deshidratasas, entre otras (Simon y Daniel, 2011). Mediante la utilización de PCR y sus distintas modalidades, enfocados al análisis metagenómico, también se han encontrado diversas nitrato- reductasas dependientes de cobre procedentes de arqueas de distintos ambientes; por otra parte, analizando el gen *tdfA*, se encontró la presencia de una

nueva deshidrogenasa degradadora de herbicidas, procedente de microorganismos de suelo (Bartossek *et al.*, 2010; Zaprasis *et al.*, 2010).

Otra de las vías de estudio de la metagenómica se basa en el análisis y escrutinio de secuencias, usando como referencias aquellas secuencias que se encuentran bien conservadas de genes conocidos o las secuencias de familias de proteínas, para el diseño de “*primers*” que sean útiles y permitan su análisis molecular. Estos estudios de diversidad microbiana en un ecosistema se realizan mediante el análisis de marcadores genéticos conservados como los genes que codifican para la subunidad ribosomal 16S, los que codifican para el factor de elongación de tubulina, genes de la proteína 70 de shock térmico, factor G, entre otros (Venter *et al.*, 2004); otras evidencias demuestran que los estudios metagenómicos se enfocan también al análisis de virus (Tamaki *et al.*, 2011); sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado solo al análisis de bacterias, dejando de la lado las poblaciones comunidades fúngicas y de otros organismos eucariotas.

Existen diversos métodos para el análisis molecular de diversas fuentes de microorganismos. El análisis de estas secuencias mediante pirosecuenciación conlleva y confiere un análisis más profundo con relación a algunas técnicas tradicionales como electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o secuenciación por método de Sanger (Tiedje *et al.*, 1999; Fierer y Jackson, 2006). Actualmente, los análisis moleculares de nueva generación se utilizan en diversos estudios para determinar las poblaciones microbianas no aisladas. Gu *et al.*, (2019) demostraron la posibilidad de identificar microorganismos procedentes de muestras clínicas, mediante el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación.

Diversas aplicaciones se han direccionado hacia el análisis de muestras ambientales, donde la identificación de microorganismos en distintas fuentes de agua se realizó, con el objetivo de entender las fuentes de contaminación, la calidad del agua estudiada y los riesgos potenciales que se pueden presentar en la población; identificando microorganismos como *Leptospira*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Norovirus* y *Cryptosporidium* (Shanks *et al.*, 2007; Hass *et al.*, 2014). La tecnología Illumina poco a poco ha sido introducida en el mercado para el análisis de secuencias de organismos procedentes de muestras ambientales, rivalizando con los procedimientos de pirosecuenciación; sin embargo, estas secuencias no han sido ampliamente aceptadas, aunque la tendencia se dirige hacia emersión de estas tecnologías en

los análisis ambientales (Tan *et al.*, 2015). La aplicación de análisis bioinformáticos a las secuencias obtenidas es de vital importancia para obtener resultados de similitud y homología entre especies, así como información filogenética. Existen dos vías principales para el análisis de estas secuencias:

- i) aplicaciones basadas en la similitud de secuencias, y
- ii) aplicaciones con base en la composición de las secuencias analizadas. Bases de datos BLAST (Basic Local Alignment Tool), MEGAN (Metagenomic Analyzer)

Ambas se emplean frecuentemente; sin embargo, la totalidad de las secuencias no han sido analizadas y reportadas, lo que podría derivar a ciertas limitaciones al momento de realizar los análisis bioinformáticos (Simon y Daniel, 2011).

Las aplicaciones basadas en la composición de secuencias toman en cuenta ciertas características intrínsecas de las secuencias como porcentaje de GC, uso de codones, frecuencia de oligonucleótidos; para posteriormente compararlos con secuencias ya referenciadas (Karlin *et al.*, 1997; Bentley y Parkhill, 2004; Bailly *et al.*, 2006). Por tanto, la utilización de herramientas moleculares para el estudio de genomas procedentes de muestras ambientales es una opción prometedora para la clasificación taxonómica e identificación de microorganismos no cultivables.

2.5 Subproductos de las microalgas posterior al tratamiento de aguas y su utilización en la alimentación animal

Diversos estudios que demuestran la presencia de nutrientes de alto valor agregado en diversos tipos de algas, algunas usadas en procesos de tratamiento de aguas. Existen tendencias que direccionan el mercado hacia los alimentos funcionales, encontrando que el 20% del total del mercado de alimentos pertenece a los alimentos funcionales, observando que suplementos alimenticios a base de biomasa de microalgas puede ser una fuente rica de prebióticos y productos para suplementación mineral (Paniagua-Michel *et al.*, 2015); además, algunas especies se caracterizan por producir cantidades considerables de ácidos grasos polinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés), principalmente ácido

docohexanóico y eicosapentanóico, los cuales se han extraído y han sido adicionados a fórmulas de leche para infantes en Europa. Sin embargo, es importante entender que la presencia de ciertos nutrientes en el cultivo para microalgas influye en la producción de moléculas de valor agregado en la biomasa, donde la presencia de algunos nutrientes puede incrementar la producción de proteínas mientras disminuye la de lípidos y polisacáridos, o viceversa (Lavens y Sorgeloos, 1996) existiendo diversos factores y evidencias que sugieren la utilización de microalgas para la asimilación de distintos componentes y la generación de sustancias con alto potencial para la alimentación.

Un factor que refuerza lo antes mencionado es que la utilización de grandes extensiones de tierra para la generación de alimentos, la potencial aparición de enfermedades zoonóticas que afectan a animales de consumo, la utilización de grandes cantidades de antibióticos en los alimentos usados para la engorda para ganado que desencadenan la generación de enfermedades resistentes a los mismos, son algunas de las razones que se toman en cuenta para la búsqueda de nuevas alternativas que permitan generar aditivos alimenticios de alta calidad. Qiu *et al.* (2019) evaluaron el tratamiento con dos cepas de *Chlorella* (L166 y L38), esto sobre agua residual procedentes del cultivo y producción de soya, observándose una remoción eficiente en la materia orgánica, fósforo y nitrógeno; aunado a esto, se reportaron producción de polisacáridos (2.86 mg/L/d) y lípidos (7.22 mg/L/d), indicando potencial uso como suplemento nutricional o para la producción de biodiesel.

Existen evidencias de la producción de moléculas de interés, en diversas microalgas, encontrándose en ellas lípidos, proteínas, pigmentos y vitaminas; todas con potencial nutricional. *Chlorella* sp. ha arrojado producciones de 50-58% de proteínas, 10-22% de lípidos y 12-26% de polisacáridos, esto con relación al peso seco de la biomasa producida (Koyande *et al.*, 2019). Se ha reportado que algas del género *Chlorella*, además de ser un microorganismo que participa en la remoción microbiológica de nutrientes y contaminantes presentes en aguas residuales, generan componentes usados como aditivos para la alimentación como vitaminas del complejo B, E, K y D; proteínas, aminoácidos, pigmentos, 30% de lípidos (peso seco) y valores por encima del 40% de glicerol (Avagyan, 2010).

El uso de microalgas para la alimentación de rumiantes se ha tratado de implementar en vacas y corderos, observándose fenómenos de baja ingesta debido a la presencia de un

sabor desagradable, fenómeno que influye sobre la observación de los cambios en el animal (Madeira *et al.*, 2017). Wild *et al.* (2019) reprodujeron una simulación del proceso de fermentación ruminal, donde evaluaron el efecto de las condiciones de crecimiento de *C. vulgaris* y el contenido de moléculas con potencial nutricional, observando que la deficiencia de nitrógeno y CO₂ influyen de manera adversa sobre el contenido protéico de la microalga, dicha deficiencia se presenta debido a la producción de gas en el rumen. Sin embargo, hay reportes de con evidencias favorables acerca del uso de microalgas como suplemento alimenticio en animales.

Un estudio realizado en cabras demostró los efectos positivos de la aplicación de *C. vulgaris* como suplemento alimenticio (10 g biomasa liofilizada/kg), acompañado de alfalfa, aunque suministrados por separado. Se observó el incremento de comunidades metanogénicas (*Methanobrevibacter* sp., *Methanogens* sp.). Aunado a esto, se observó un decremento en la actividad celulasa; incremento en la actividad proteolítica (*Clostridium sticklandii*), y el incremento de ácidos grasos de cadena larga monoinsaturados, observándose en conjunto incremento en la actividad de biohidrogenación acompañada del incremento significativo de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Tsiplakou *et al.*, 2017). Cabe mencionar que las investigaciones de microalgas y su aplicación como suplemento alimenticio para rumiantes pequeños no ha sido un tópico ampliamente estudiado.

3. Justificación

La necesidad de recuperar las fuentes de agua, esto después de su uso y contaminación, es una prioridad para el ambiente y el ser humano, es por lo anterior que se buscan alternativas novedosas y sobre todo sustentables, que reduzcan los riesgos ambientales y que restauren la calidad del agua en los niveles más altos posibles; aunado a esto, algunas de las alternativas biotecnológicas que cumplen con las características anteriores, incluyen microorganismos con la capacidad de asimilar las sustancias presentes en el agua sintetizando como subproductos, moléculas de alto valor agregado, con potencial uso en la alimentación humana, animal; entre otros usos industriales. Por tanto, en el presente trabajo, se pretende optimizar condiciones del cultivo y proceso buscando determinar los efectos de dicha optimización en la remoción de contaminantes, y la generación de proteínas y lípidos de importancia nutricional, así como la evaluación de la biomasa generada, como suplemento alimenticio en cabras Saanen.

4. Hipótesis

1. Es posible optimizar las condiciones del proceso secundario a nivel de biorreactor para el saneamiento de aguas residuales (antropogénicas y agrícolas) con la aplicación de fotoperíodos en la comunidad microbiana definida para el tratamiento de dichas aguas.
2. La biomasa obtenida del proceso secundario ayuda a mejorar la nutrición del ganado caprino al darla como suplemento alimenticio.

5. Objetivo general

Identificar a nivel molecular las poblaciones microbianas; evaluar, de manera complementaria, el efecto de los consorcios microbianos formados por microorganismos heterótrofos y microalgas presentes, para elucidar el mecanismo de remoción de nutrientes orgánicos logrando el tratamiento de aguas residuales, obteniendo, como subproductos, proteínas y lípidos de interés para la nutrición animal.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar mediante biología molecular y metagenómica, las poblaciones de la comunidad microbiana en el proceso secundario para el saneamiento de aguas residuales (antropogénicas y agrícolas) del arroyo “La encantada” en Saltillo, Coahuila.

2. Evaluar a nivel de laboratorio la eficacia en la remoción individual de contaminantes, el rendimiento de biomasa y la producción de grasas y proteínas de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Bacillus subtilis* y *Penicillium* sp.

3. Identificar los consorcios microbianos compuestos por los microorganismos mencionados y evaluar su potencial metabólico para el saneamiento de aguas residuales.

4. Escalar el bioproceso para el tratamiento de agua a un sistema abierto y optimizar las condiciones del biorreactor mediante la aplicación de fotoperíodos.

5. Extraer y cuantificar proteínas y lípidos sintetizados como subproductos del bioproceso.

6. Evaluar el efecto nutricional de la biomasa de microalgas generada del bioproceso al darlo como suplemento alimenticio a cabras Saanen.

6. Metodología

6.1 Identificación de la comunidad microbiana por metagenómica

Para la identificación de los microorganismos procedentes del agua a tratar (bacterias, eucariotas y hongos) se procedió a muestrear agua de diversos puntos de arroyo “La encantada”, y se concentró la biomasa recuperada por medio de centrifugación (Imagen 1).

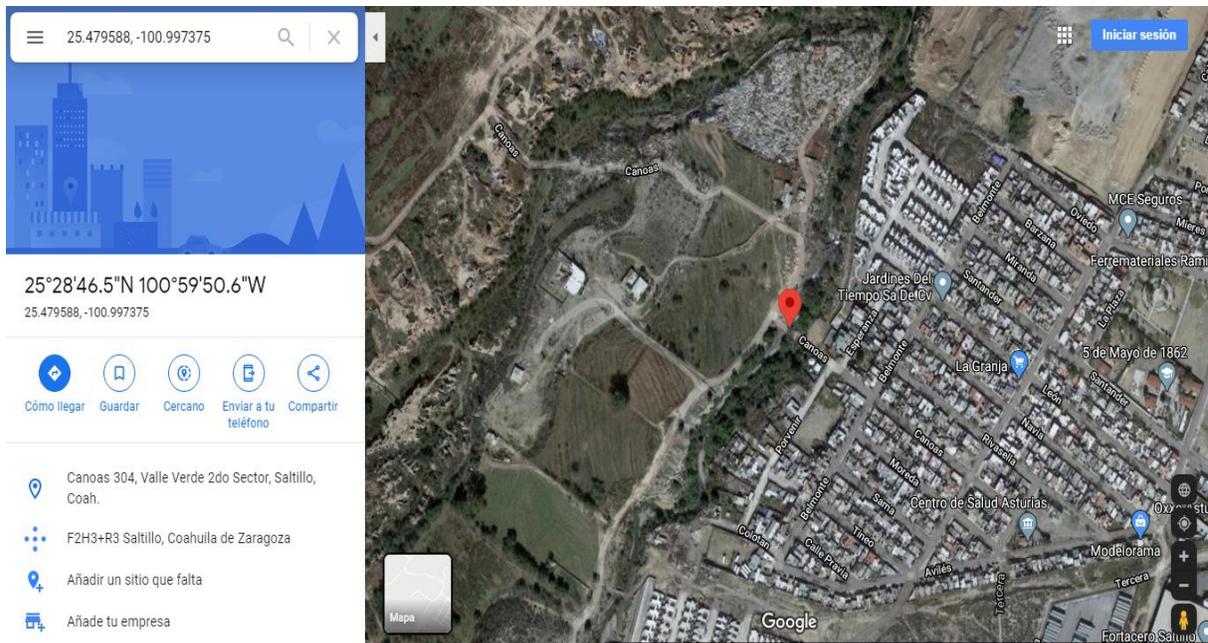


Figura 1. Ubicación del punto de muestreo del arroyo “La encantada”, ubicado en la calle Canoas, colonia Valle verde 2do sector, Saltillo, Coahuila. (25.479588, -100.997375).

La extracción de ADN se realizó a partir de la biomasa concentrada por centrifugación (10000 rpm durante 5 min) procedente de tres muestras de 1 L del arroyo, procedentes de tres puntos distintos de la misma área de muestreo. La extracción se realizó en base a las especificaciones del fabricante (Invitrogen™ Minikit de ADN genómico PureLink™).

La amplificación de las regiones de interés se realizó por *Next Generation Sequencing* (NGS), con el sistema MiSeq de Illumina, generando librerías que contenía una secuencia de oligonucleótidos que fueron acoplados a los cebadores que amplifican los genes que codifican para las regiones ribosomales 16s (bacterias), 18s (eucariotas) e ITS (hongos).

La adición de adaptadores en el extremo 5' para la plataforma Illumina fueron 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3', adicionado en los oligonucleótidos *forward* y el adaptador 5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3', adicionado en los oligonucleótidos *reverse*.

La generación de amplicones para la identificación de bacterias se obtuvo a partir del gen que codifica para la región ribosomal 16s, con los oligonucleótidos: 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991).

La identificación de eucariotas (algas) se direccionó a la amplificación de la región ribosomal 18s con las secuencias: F18S 5'-GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTT-3 y R18S 5'-GCAACTAATGCAGGGACGGGA-3' (Gross *et al.*, 2001) y para la identificación de hongos se amplificó la región ribosomal ITS con los cebadores: ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Gardes y Burns, 1993; White *et al.*, 1990).

Todas las secuencias se amplificaron en un equipo termociclador T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) con una enzima de tipo *hot start* (Invitrogen Platinum™ SuperFi™, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Las reacciones consistieron en un mix (volumen final 50 µL) a 1x del 2X Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix, 0.1 µM de cada oligonucleótido, 1x de enhancer y 1 µl de DNA (20 ng/µL). El programa de corrida incluyó una temperatura inicial de desnaturalización por 30 s a 98 °C, seguido por 35 ciclos de 10s de desnaturalización a 98 °C, 30s de alineamiento a 56.7 °C, 2 min extensión a 72 °C seguido de una extensión final por 5 min a 72 °C. Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1% con Buffer SB 1x utilizando el marcador de 100 pb Ladder (Promega, Madison, WI), teñido con bromuro de etidio, además se visualizaron las bandas bajo luz UV (BioRad Gel Doc™ XR+ /software ImageLab 5.2.1). La purificación de los productos de las amplificaciones se realizó directamente de los PCRs (Wizard®PCR Preps DNA Purification System de Promega) y se contabilizaron y ajustaron a un mínimo de 250 ng en un espectrofotómetro (NanoDrop Lite; Thermo Fisher Scientific) con una absorbancia mínima de 1.8, para su secuenciación comercial con el sistema MiSeq de Illumina, en el formato 2 × 300 (Krohn-Molt *et al.*, 2017).

6.2 Actividad remediadora de las cepas evaluadas de manera individual

En frascos de vidrio de 1 L previamente esterilizados, se muestreó agua procedente del arroyo “La encantada”, en el punto cercano a la colonia Valle Verde 2do sector, de la ciudad de Saltillo Coahuila. Éste se caracteriza por ser un arroyo con una pequeña corriente de agua, acompañado de zonas donde el agua se estanca y la materia orgánica precipita. Es una zona del arroyo que contiene agua contaminada a causa de que es un lugar usado como vertedero irregular de basura y diversos tipos de contaminantes.

Ambas microalgas son procedentes del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, en La Paz, Baja California Sur, de la colección de microalgas del centro; la cepa de *Bacillus subtilis* se obtuvo del cepario de la Unidad de Formulación de Biológicos, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL; y la cepa de *Penicillium* sp fue proporcionada por el Dr Efrén Robledo Leal, del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Dentro del experimento, se procedió a definir los siguientes tratamientos: el tiempo inicial del proceso (agua muestreada. T0), un control negativo (CN, agua muestreada sin inóculo), y agua tratada con *Bacillus subtilis* (B.s.), con *Penicillium* sp. (P. sp), con *Chlorella vulgaris* bajo luz (L), Agitación (A), ambas (L y A); *Chlorella sorokiniana* bajo luz (L), Agitación (A), ambas (L y A). Se dosificó cada matraz Erlenmeyer con 250 mL de agua contaminada procedente del arroyo. Previo a su inoculación, cada microorganismo fue llevado a su fase exponencial. En el caso de las microalgas, ambas fueron crecidas en medio BG11 (Reyna-Martínez *et al.*, 2015), hasta alcanzar una concentración de $5.6 \times 10^7 \pm 7 \times 10^2$ células/mL.

El cultivo tuvo una duración de 18-21 d, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6, a una longitud de onda de 647nm. Los matraces recibieron ciclos de luz- oscuridad de 12 h (1380 lumens), agitación a 130 rpm a temperatura ambiente. *B. subtilis* se cultivó durante 20-24 h a 37 °C en caldo nutritivo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a una longitud de onda de 660nm (Kacena *et al.*, 1999). El cultivo de *Penicillium* sp. se realizó en base a lo propuesto por Johnstone-Robertson *et al.* (2008), con algunas variantes. Se cultivó en PDA durante 65-72 h a un rango de temperatura de 24-29 °C, posterior a ese tiempo se recuperaron conidios en una solución de tween 80 para posteriormente ser contadas en una cámara de Neubauer, donde se colocaron 12.5 mL de una suspensión de 1.5×10^7

conidios/mL. Se inocularon 12.5 mL de cada microorganismo para definir una concentración del 5% v/v, y se colocaron en las siguientes condiciones de cultivo: bajo luz (1380 lm) y agitación (130 rpm). Previo al inicio del bioproceso, se determinó en el agua muestreada la conductividad (Cond), pH, turbidez, oxígeno disuelto (DO), materia orgánica (OM), nitrógeno total (N), demanda química de oxígeno (COD), demanda bioquímica de oxígeno (BOD); y los mismos parámetros se determinaron para cada uno de los tratamientos después de 13 días de duración que tuvo el tratamiento de aguas (Ballesteros-Torres *et al.*, 2019).

Dichos parámetros se compararon contra los valores permisibles establecidos en las siguientes normas:

- Conductividad: NOM- CCA- 032- ECOL/1993
- pH: NOM- 001- SEMARNAT- 1996
- Turbidez: NMX-AA-038-SCFI-2001
- Oxígeno disuelto: NMX-AA-012-SCFI-2001
- Materia orgánica, nitrógeno, DQO y DBO: NOM- 001- SEMARNAT- 1996 y NMX-AA- 028.

Los parámetros de conductividad (Multiparametro pH/CE/TDS/Temp HI 98129 – HI 98130), pH (Multiparametro pH/CE/TDS/Temp HI 98129 – HI 98130), turbidez (Turbidímetro digital portátil/Hanna Instruments HI93703C) y oxígeno disuelto (Medidor de oxígeno disuelto Hanna Instruments HI 9146-04) se realizaron de manera digital teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante. Dichos instrumentos se calibraron en base a las especificaciones proporcionadas por el fabricante. En el caso de la materia orgánica, se tomaron 2 mL de muestra de agua y se colocaron en un matraz Erlenmeyer, a que se le agregaron 10 mL de $K_2Cr_2O_7$, 20 mL de H_2SO_4 , como producto se esta mezcla se presentó una reacción exotérmica, por lo que se esperó al atemperamiento para añadir 100mL de agua destilada. Para la determinación de la materia orgánica, se tituló cada matraz con $FeSO_4$ 1N, añadiendo previamente 6 gotas de ortofenantrolina como indicador. La finalización de la reacción se presentó con un cambio de un color naranja a un color rojo ladrillo (fin de la titulación), pasando por un color verde oscuro y verde turquesa (Ballesteros-Torres *et al.*, 2019).

El porcentaje de materia orgánica se calculó dividiendo la diferencia del volumen de titulación entre el blanco y cada muestra, entre el volumen de muestra utilizado. En el caso de la demanda química de oxígeno (DQO), a un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 20 mL de la muestra, 0.5 mg de $MgSO_4$, 25 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0.25N y 30 mL de $H_2SO_4-Ag_2SO_4$, para posteriormente colocar los matraces a reflujo durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se procedió a titular con sulfato de amonio ferroso (SAF), utilizando ortofenantrolina como indicador. La finalización de la reacción se presentó con un cambio de un color naranja a un color rojo ladrillo (fin de la titulación), pasando por un color verde oscuro y verde turquesa. La DQO se obtiene como producto de la multiplicación de la diferencia entre el volumen de SAF usado en el blanco menos el volumen del SAF usado en la muestra, la normalidad del $K_2Cr_2O_7$, 8000; dividido entre el volumen de muestra. Mediante el uso de botellas de Winkler, se mezclaron 300mL de agua de dilución ($CaCl_2$, PBS, $MgSO_4$, Fe_2Cl_3), 30 mL de muestra y 1 mL de caldo soya tripticasa. Se incubaron a 20 °C durante 5 d. La DBO5 se obtuvo como resultado de calcular la diferencia entre el oxígeno disuelto del blanco menos el determinado en cada muestra, dividido entre el factor de dilución (Ballesteros-Torres *et al.*, 2019).

El proceso de tratamiento y la determinación de cada uno de los parámetros fisicoquímicos se realizó por triplicado para ser comparado por medio de un ANOVA de un factor, con un post hoc Tukey ($p = 0.05$).

6.3 Determinación de grasas y proteínas en la biomasa de microalgas obtenidas del tratamiento individual de aguas.

Posterior al tratamiento de aguas realizado durante 13 días se procedió a determinar el rendimiento de biomasa, la concentración de biomasa, grasas y aceites totales (NMX-F-089-S-1978) y proteínas, evaluando las diferencias entre los tratamientos correspondientes a *C. vulgaris* bajo condiciones de luz, agitación y ambas; *C. sorokiniana* bajo condiciones de luz, agitación y ambas; y el control negativo.

Se determinó el rendimiento, concentración, y grasas y aceites totales con la técnica gravimétrica. Previo al proceso de la biomasa obtenida, se determinó el rendimiento de biomasa del total del procedimiento, al establecer la diferencia entre el peso de los matraces

posterior al proceso de tratamiento y uno con 250 mL de agua residual sin tratar; donde la diferencia se reportó en g/250 mL. Para la determinación de la concentración de biomasa se colocaron 15 tubos de ensayo de 18 × 150, previamente lavados y secados, a un rango de temperatura de 70-80°C, durante 5 días, con propósito de tenerlos a peso constante. Se colocó en cada tubo una muestra de 1mL procedente del matraz tratado, esto con una previa agitación y homogenización de la muestra. Los tubos con la muestra se colocaron en el horno a una temperatura de 70-80°C, durante 12 días, hasta obtener un peso constante. Por diferencia de peso, se determinó la concentración de biomasa, esto teniendo en cuenta un tubo, a peso constante, sin la adición de biomasa. La determinación de grasas y aceites totales se determinó en base a lo estipulado por la NMX-aa-005-scfi-22013.

Por otra parte, la determinación de proteínas se realizó en base a lo publicado por (Mæhre *et al.*, 2018), con algunas modificaciones. La lisis de la biomasa obtenida se realizó mediante la combinación de métodos físicos. Antes de su procesamiento, se colocó 1mL de muestra de cada tratamiento, previamente agitando y homogenizando la muestra, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL (cinco de cada tratamiento), se centrifugaron los tubos (10, 000 rpm; durante 1.5 min a temperatura ambiente) para posteriormente recuperar el agua sobrante, que se usó como mismo medio para la resuspensión de la biomasa tratada. Después de lo descrito arriba, los tubos con la biomasa se colocaron a -80°C durante 1 h, para posteriormente triturarlos de manera manual con un pistilo de plástico durante 2-4 min. Después de ese tiempo transcurrido, los tubos se sometieron a un proceso de sonicación durante 15 min. El agua separada al inicio fue devuelta a cada tubo, respectivamente, siendo la muestra utilizada para la cuantificación de proteínas. Para el establecimiento de una curva exponencial estándar como base para la determinación de la concentración de proteínas, utilizando albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Se realizaron diluciones seriadas 1:2 en una placa de poliestireno de 96 pozos con fondo plano, mediante el siguiente procedimiento. En los primeros tres pozos de la hilera A, se colocaron 200 µL de BSA (1 mg/mL), y en los siguientes de las hileras restantes, se colocaron 100 µL de solución salina al 0.85 %, previamente esterilizada. Se transfirieron de pozo a pozo 100 µL de la albúmina, secuencialmente. Por separado, se colocaron en cinco pozos, 100 µL de cada muestra y, al igual que el resto de los pozos, se les añadió 100 µL del reactivo de Bradford. Las absorbancias se determinaron a una longitud de onda de 595 nm. A partir de la ecuación

obtenida de la curva estándar, se obtendrán las concentraciones de proteína de cada tratamiento.

El procedimiento se realizó por triplicado para posteriormente ser comparado por un ANOVA de un factor, con un posthoc Tukey ($p = 0.05$).

6.4 Evaluación de la actividad remediadora de los consorcios microbianos.

La actividad remediadora se evaluó para los microorganismos participantes en el presente estudio, esto en combinación entre ellos y diversas condiciones de cultivo; procedimiento con una duración de 12 semanas. Dicho proceso se realizó tomando en cuenta lo realizado por Roman y Brennan (2019), con los ajustes necesarios para evaluar las condiciones estipuladas en este estudio. En nueve charolas de plástico con capacidad de 28 L, se colocaron 10 L de agua contaminada procedente del arroyo “La encantada”, las cuales fungieron como reactores para un sistema abierto, en el cual, el agua contaminada se adicionó cada semana hasta rellenar el volumen inicial. A partir del agua procesada se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) *C. sorokiniana* + *B. subtilis* + luz (C.s. + B.s. L); 2) *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. + luz (C.s.+ P. sp. L); 3) *C. vulgaris* + *B. subtilis* + luz (C.v. + B.s. L); 4) *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. + luz (C.v.+ P. sp. L); 5) *C. sorokiniana* + *B. subtilis* (C.s.+ B.s.); 6) *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. (C.s.+ P. sp.); 7) *C. vulgaris* + *B. subtilis* (C.v.+ B.s.); 8) *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. (C.v.+ P. sp.); y 9) Control negativo, correspondiente a agua sin inocular. Los reactores inoculados recibieron 0.5 L de una suspensión microbiana, donde 0.25 L correspondieron a un organismo autótrofo y 0.25 L al heterótrofo. El inóculo de las cepas se preparó de la manera ya descrita con anterioridad. La concentración final del inóculo fue de 5% v/v en relación al volumen total. Cada semana, se procedió a muestrear 0.5 L de cada charola y se le determinó conductividad, pH, turbidez, oxígeno disuelto, materia orgánica, nitrógeno total, DQO y DBO, en base a lo estipulado a las normas oficiales y mexicanas mencionadas con anterioridad. Para la agitación y saturación de oxígeno, cada reactor contuvo una bomba (capacidad = 5000 CFM), y luz (1380 lm). El ensayo se realizó por duplicado, estableciendo las diferencias entre los tratamientos usando una comparación de pendientes y elevaciones mediante la distribución de Fisher.

6.5 Bioensayo del potencial nutricional de la biomasa resultante.

La biomasa obtenida como resultado del proceso abierto de tratamiento de aguas, se utilizó como suplemento alimenticio en cabras Saanen. El experimento se planteó en base a lo estipulado por Tsiplakou *et al.* (2017), con las modificaciones acordes a las necesidades del presente estudio. Los especímenes participantes del ensayo fueron procedentes del municipio de Abasolo, Coahuila; propiedad del señor Alejandro Castañeda Rodríguez. Los animales se encontraban en un corral localizado en el patio trasero de la casa del dueño, con espacio suficiente para mantener diversos animales. Se seleccionaron cinco cabras hembras de cinco meses de edad, ya en etapa de destete, las cuales se marcaron con aretes para su correcta identificación. El proceso de aretado se realizó con una semana de antelación, esto con relación a la realización del bioensayo, donde a la vez, se armaron los corrales individuales para colocar cada cabra. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: cabra 3 (C3= C. v. + B.s. L); cabra 4 (C4= C. v. + P sp L); cabra 5 (C5= C. s. + B. s L); cabra 6 (C6= C. s. + P. sp L) y cabra 7 (C7= control negativo).

Los tratamientos correspondientes a la combinación de organismos sin la aplicación de luz se descartaron en el presente experimento ya que no presentaron crecimiento de la biomasa de microalgas visible, lo cual se convirtió en un criterio de inclusión en el estudio. La biomasa recuperada de los reactores se dosificó de manera que cada cabra fuera suplementada con un total de 9 dosis, cada una de 10gr de biomasa húmeda (biomasa filtrada para eliminar el exceso de agua), esto durante los 18 días de bioensayo, aplicándose cada tratamiento en días salteados (día 1, día 3, día 5, etc.). Cada dosis se resuspendió en 1 L de agua de la comúnmente se le daba a beber a los animales. Complementariamente, además de la biomasa suplementada, las cabras recibieron diariamente una mezcla de zacate de paca y 0.5 kg de cría vacuna (proteína= 18% y grasa= 2%). Se definieron 3 tiempos para la medición de los parámetros a evaluar, siendo el T0 al inicio del ensayo y previo a cualquier suplementación; el T1, después de transcurrido el 50% del tiempo del bioensayo; y T2, al haber transcurrido el 100% del tiempo del ensayo; donde en cada uno de estos tiempos se evaluó el peso, y dentro de los parámetros bioquímicos la glucosa (Gl), el ácido úrico (A.U.), la urea (U), la creatinina (C), los triglicéridos (T) y el colesterol (Cl).

Para la determinación del peso, cada una de las cabras fue amarrada de la parte ventral para posteriormente ser colgada determinando así su peso. La extracción de sangre se realizó

por medio de una punción yugular utilizando tubos con tapón rojo, para ser posteriormente analizados. Los resultados se emplearon como producto de un análisis cualitativo de datos (Ballesteros-Torres *et al.*, 2019).

De manera complementaria, se analizó el porcentaje de grasas totales y proteínas (NMX-F-068-S-1980), teniendo como referencia para grasas a la norma mexicana especificada con anterioridad. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre los tratamientos ($p = 0.05$).

7. Resultados

7.1 Análisis de poblaciones microbianas

Se analizó mediante secuenciación masiva en la plataforma Illumina-MiSeq, un conjunto de muestras de ADN procedentes del agua a tratar, de manera que pueda indagarse la población microbiana presente en la muestra y como esta puede intervenir o influenciar sobre la remoción de nutrientes y contaminantes, además de la relación con los organismos participantes del estudio. Se procedió a analizar las poblaciones de bacterias (16s), hongos (ITS) y diversos organismos eucariotas (18s) mediante la amplificación de regiones ribosomales, que se caracterizan por ser altamente conservadas, y a su vez, utilizadas para la identificación microbiana hasta el nivel de género y especie.

En el caso de los organismos identificados con los *primers* 16s, específicos para bacterias, se clasificaron un total de 46958 secuencias en los diferentes órdenes taxonómicos. 11875 identificadas en el nivel de reino, 8795 en phylum, 7442 en clase, 6229 en orden, 5759 en familia, 3823 en género y 3035 en especie; identificándose lecturas de virus pertenecientes al grupo II. El filo más abundante fue *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria*; encontrándose en menor proporción *Firmicutes*. Dentro de esos filos, se seleccionó un top 20 de los organismos con mayor abundancia dentro de las lecturas identificadas y se describen a nivel de género y especie. Se encontró la cianobacteria *Nostoc microspicum* como la especie más abundante; *Desulfovibrio* (especie no clasificada) y *Leptothrix discophora*, y en la misma proporción: *Marinitoga hydrogenitolerans*, *Arthrobacter creatinolyticus*, especies no clasificadas del género *Clostridium*, especie no clasificada del género *Marinobacter*, *Desulfonatronum thiosulfatophilum*; especie no clasificada de un género candidato a *Phytoplasma*, *Arenimonas malthae*, *Thioalkalimicrobium sibiricum*, especie no clasificada de *Rhodobacter*, *Propionigenium modestum*, especie no clasificada de *Paenibacillus*, *Oxalobacter vibrioformis*, *Calothrix parietina*, *Thiothrix fructosivorans*, especie no clasificada de *Marinitoga*, *Desulfovibrio psychrotolerans* y *Amaricoccus kaplicensis* (Figura 1).

Dentro de las secuencias amplificadas dentro de este grupo de organismos, se detectaron un total de 1561 lecturas correspondientes al fago PhiX 174. Cabe destacar que la

mayoría de las lecturas identificadas (116,717) pertenecen a organismos procariontes no identificados.

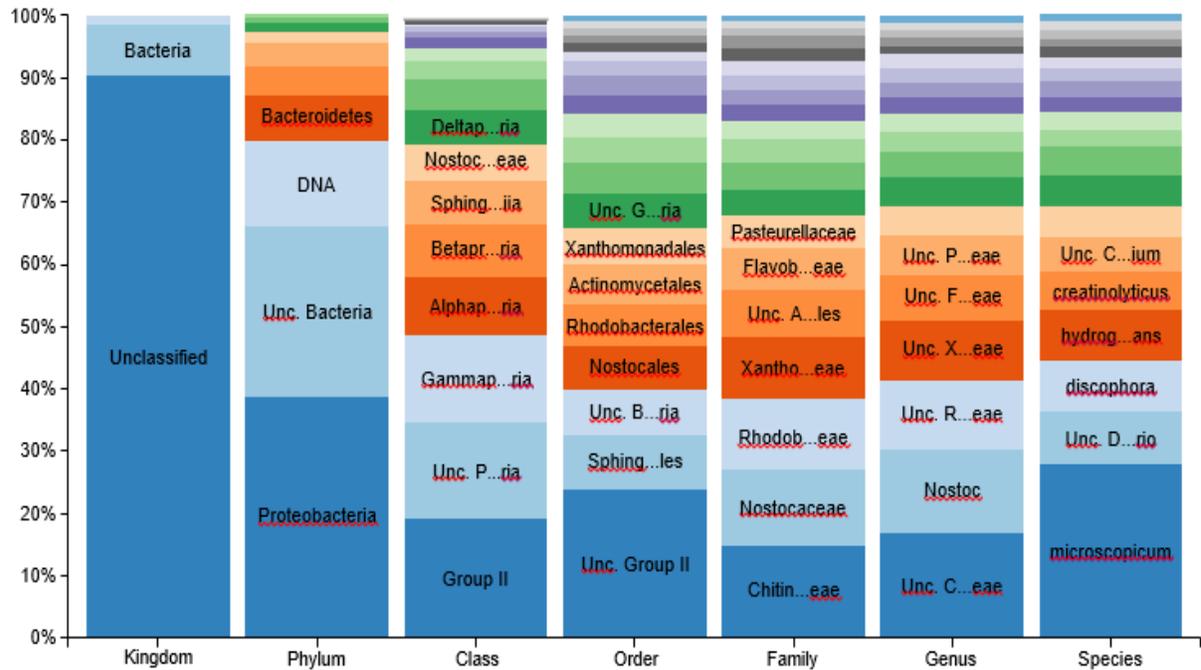


Figura 2. Relación entre el porcentaje de abundancia y las especies bacterianas identificadas por secuenciación masiva en la plataforma Illumina a partir de las secuencias amplificadas con el uso de los cebadores 16s. (file:///E:/Seminario%20final/PT1MA4SS01_16s.html).

En el caso de los organismos eucariotas identificados con los *primers* 18 se identificaron analizaron un total de 24113 secuencias, a partir de las cuales se seleccionaron 18 organismos que aparecieron con mayor frecuencia en la identificación microbiana. En orden descendente, *Durinskia baltica* aparece como el microorganismo más abundante; una serie de organismos eucariotas no clasificados ocupan el siguiente grupo más numeroso: *Bumilleriopsis* sp; *Uronema* sp.; *Achnanthidium digitatum*; *Chlamydomonas sordida*; *Neosporangiococcum* sp.; *Cyclotella* sp.; *Psammodictyon constrictum*; *Stigeoclonium* sp.; *Chlamydomonas* sp. BR020; *Gomphonema affine* var. *affine*; *Chlamydomonas* sp. ICE-MDV.

Cabe destacar que se identificaron organismos en menor proporción; encontrando metazoarios como larvas rhabditoides, entomopatógenos como *Acrostichus halicti*; *Monochoides* sp., nematodo depredador de vida libre; *Brachionus calyciflorus*, un rotífero de interés en toxicología, ecología y evolución. Otro organismo identificado de relevancia

fue *Paraphysomonas* sp., algas doradas presentes en agua dulce con características oligotróficas.

Otro organismo presente en menor proporción fue *Nuclearia pattersoni*, ameba que tiene la capacidad de ser anfitrión. Por último, *Nannochloropsis* sp., ha demostrado ser de importancia en la producción de ácidos grasos poliinsaturados y por ser transfectable (Figura 2).

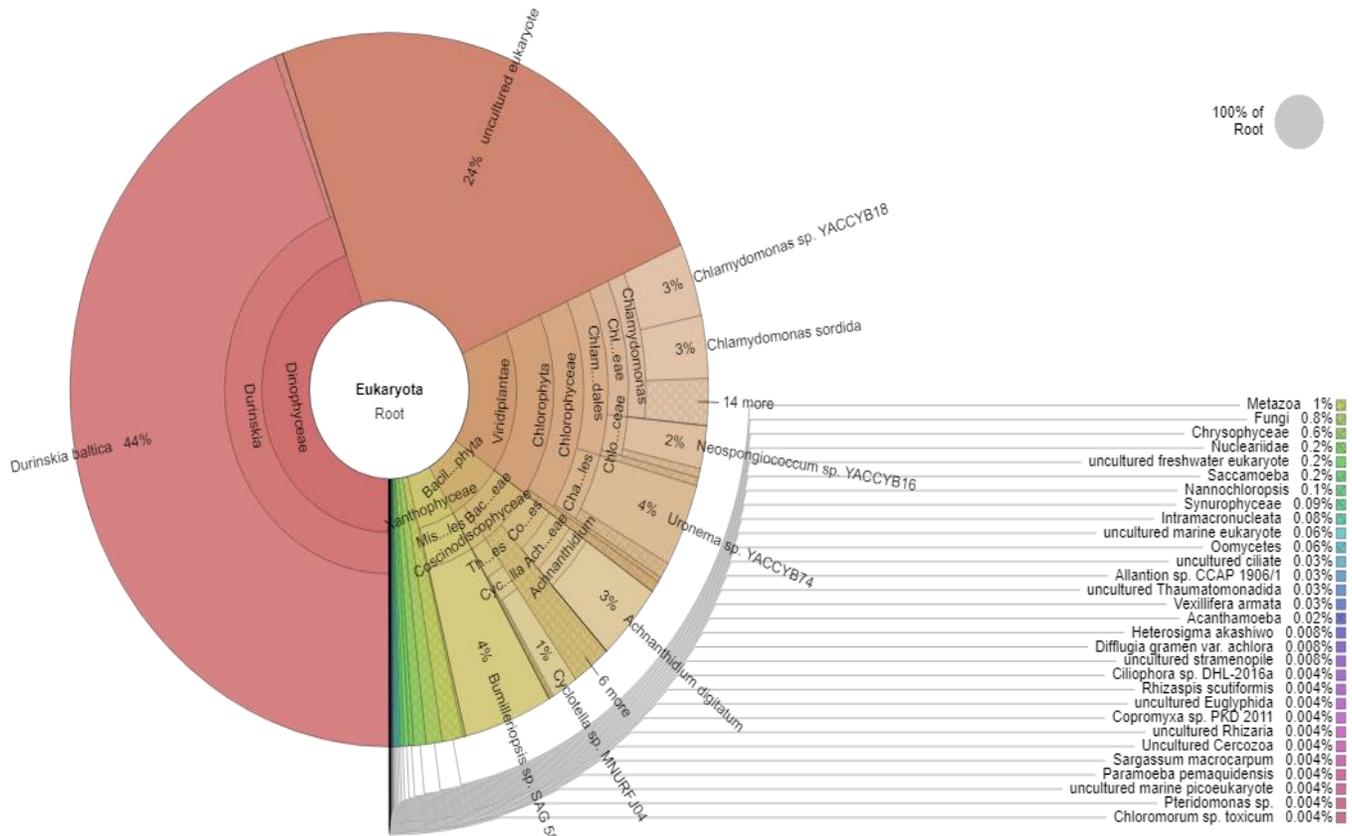


Figura 3. Relación entre el porcentaje de abundancia y las especies eucariotas identificadas por secuenciación masiva en la plataforma Illumina a partir de las secuencias amplificadas con el uso de los cebadores 18s.

(<file:///E:/Seminar%20final/PT1MA4SS02.18S.html>).

En el caso de los hongos se identificaron 7 filos, dentro de los cuales se encuentran géneros y especies de interés. Los ascomicetos fueron los hongos identificados en mayor proporción, donde se encuentran diversas especies pertenecientes al género *Candida*, *Cyberlindnera fabianii*; especies del género *Morchella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Dictyosporium*, *Alternaria*, *Cladosporium*. El phylum *Chytridiomycota* tiene como principal representante a *Kochiomyces dichotomus*, y diferentes especies del género *Rhizophyidium*.

var *microsporus* la más abundante; *Zychaea mexicana*, *Radiomyces embreei*, *Motierella epigama*; entre otras especies identificadas.

7.2 Análisis de actividad metabólica y de componentes celulares a través del cálculo del índice de finalización de módulos (IFM)

Mediante la utilización del Evaluador de potencial metabólico y fisiológico del genoma (MAPLE, por sus siglas en inglés) se procedió a un mapeo de genes a partir de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genomes), esto con el propósito de establecer módulos funcionales mediante el cálculo del índice de finalización de módulos (IFM; MRC, por sus siglas en inglés) que permitan proponer las vías y funciones metabólicas que están encendidas en los diversos microorganismos, permitiendo entender, desde un punto de vista bioquímico, como es que se están asimilando los diversos nutrientes y contaminantes presentes en el agua.

Para el siguiente análisis se seleccionaron genomas que concordaban, al menos a nivel de género, con cepas las encontradas en el análisis metagenómico anterior; cabe mencionar que no todas las cepas encontradas en el análisis metagenómico están reportadas en la base de datos KEGG. Las cepas analizadas se denominan mediante el uso de códigos, que son introducidos en la base de datos, y que además se usan como identificación (Tabla 1).

<https://maple.jamstec.go.jp/maple/maple-2.3.1/cgi-bin/listOrg.cgi>

Para elucidar la actividad de las vías metabólicas entre los diversos microorganismos, se establecieron mapas de calor, indicando el mayor valor en un color rojo, y el valor menor en un color amarillo. La diferencia entre los índices de finalización de módulos se establece con las diferencias de color determinado por el mismo mapa.

Se observó que, al analizar las vías relacionadas al metabolismo central de carbohidratos, se observa que la mayoría de los microorganismos analizados utilizan la ruta que comprende desde el desdoble de la glucosa hasta la formación de acetil-CoA (índices > al 70), a excepción de *Marinitoga* sp. (66.7, módulo que involucra compuestos de tres carbonos); *Nannochloropsis gaditana* presenta función < a 70 en vías glucolíticas y en la gluconeogénesis (conversión de oxalacetato a fructosa-6-fosfato); un índice de 29 en la actividad de la vía de las pentosas-fosfato; aunado a esto, no presenta actividad en el metabolismo intermediario (diversas etapas del ciclo de Krebs).

Tabla 1. Especies y códigos resultantes del análisis del índice de finalización de módulos (IFM), a partir del evaluador de potencial metabólico y fisiológico del genoma (MAPLE, en inglés)

Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	Bsu	Hongo	<i>Candida albicans</i>	Cal
Bacteria	<i>Nostoc</i> sp	Nos	Hongo	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fox
Bacteria	<i>Leptothrix cholodnii</i>	Lch	Hongo	<i>Alternaria alternata</i>	Aalt
Bacteria	<i>Marinitoga</i> sp	Marn	Hongo	<i>Puccinia graminis</i>	Pgr
Bacteria	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 21022	Arz	Hongo	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	Abp
Bacteria	<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	Clb	Hongo	<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>Asahii</i>	Tasa
Bacteria	<i>Marinobacter</i> sp. BSs20148	Mbs	Hongo	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	Cne
Bacteria	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	Psol	Alga	<i>Chlorella variabilis</i>	Cvr
Bacteria	<i>Rhodobacter</i> sp.	Rhp	Alga	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre
Bacteria	<i>Paenibacillus</i> sp. FSL R7-0331	Pae	Alga	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Ngd
Bacteria	<i>Oxalobacter formigenes</i>	Ofo			
Bacteria	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507	Calo			
Hongo	<i>Penicillium digitatum</i>	Pdp			

Candidatus Phytoplasma solani no presenta actividad metabólica en el metabolismo intermediario, solo presentando un índice de 14 en el metabolismo de la vía de las pentosas-fosfato. El resto de las cepas analizadas arrojan un IFM superior al 70, en la gran mayoría de las vías antes mencionadas, sugiriendo la obtención de energía a partir de carbohidratos presentes en el agua como materia orgánica (mapa 1).

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	Cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate	100	90	90	80	90	100	80	90	90	90	90	90	100	100	100	60	100	100	100	100	100	100
Glycolysis, core module involving three-carbon compounds	100	100	100	66.7	100	100	100	100	83	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100
Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P	100	87.5	100	75	100	88	87.5	75	88	100	88	88	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100
Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	100
Citrate cycle (TCA cycle, Krebs cycle)	88	62.5	88	50	88	63	87.5	0	88	88	75	63	88	88	88	0	88	88	75	75	88	88
Citrate cycle, first carbon oxidation, oxaloacetate => 2-oxoglutarate	100	100	100	66.7	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100
Citrate cycle, second carbon oxidation, 2-oxoglutarate => oxaloacetate	80	40	80	40	80	40	80	0	80	80	60	40	80	80	80	0	80	80	60	60	80	80
Pentose phosphate pathway (Pentose phosphate cycle)	100	100	75	71.4	100	71	87.5	14	88	88	71	100	100	100	100	29	100	88	100	88	100	100
Pentose phosphate pathway, oxidative phase, glucose 6P => ribulose 5P	100	100	33	0	100	0	66.7	0	67	67	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100
Pentose phosphate pathway, non-oxidative phase, fructose 6P => ribose 5P	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	50	100	75	100	75	100	100
Pentose phosphate pathway, archaea, fructose 6P => ribose 5P	67	50	50	0	67	0	50	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
PRPP biosynthesis, ribose 5P => PRPP	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Entner-Doudoroff pathway, glucose-6P => glyceraldehyde-3P + pyruvate	75	75	75	0	75	25	100	0	100	100	0	75	50	50	50	0	50	50	50	50	50	50
Semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, gluconate => glycerate-3P	80	60	80	20	80	80	60	40	40	60	40	60	40	40	40	20	40	40	40	40	40	40
Semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, gluconate/galactonate => glycerate-3P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0
Non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, gluconate/galactonate => glycerate	0	0	33	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 1. Mapa de calor de las vías metabólicas del metabolismo energético de carbohidratos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Las vías relacionadas a la fijación de carbono arrojan que *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. PCC 7507, *Chlorella variabilis* y *Chlamydomonas reinhardtii* presentan alto índice de finalización de módulos (IFM), esto en las vías de las pentosas fosfato y la fijación de carbono en el metabolismo del ácido crasulaceánico (mapa 2).

	Bsu	Nos	lch	marn	arz	clb	mbs	Psol	Rhp	pae	Ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	Cne
Reductive pentose phosphate cycle (Calvin cycle)	73	100	100	63.6	73	64	72.7	36	73	73	73	100	100	73	100	46	73	82	82	55	73	73
Reductive pentose phosphate cycle, ribulose-5P => glyceraldehyde-3P	50	100	100	25	50	50	75	50	25	50	50	100	100	50	100	25	50	50	50	50	50	50
Reductive pentose phosphate cycle, glyceraldehyde-3P => ribulose-5P	86	100	100	85.7	86	71	71.4	29	100	86	86	100	100	86	100	57	86	100	100	57	86	86
CAM (Crassulacean acid metabolism), dark	50	100	100	0	50	0	50	0	50	50	50	100	100	50	100	0	50	50	50	50	50	50
CAM (Crassulacean acid metabolism), light	0	0	50	50	0	0	50	0	100	50	50	0	100	50	100	0	0	50	50	50	50	50
C4-dicarboxylic acid cycle, NADP - malic enzyme type	0	25	50	25	25	0	50	0	50	50	50	25	100	25	100	0	0	25	25	25	25	25
C4-dicarboxylic acid cycle, NAD - malic enzyme type	0	14.3	14	14.3	14	0	14.3	0	14	14	14	14	86	57	100	0	57	57	57	57	57	43
C4-dicarboxylic acid cycle, phosphoenolpyruvate carboxykinase type	25	25	25	25	25	0	50	0	25	50	25	25	75	75	100	0	75	75	75	75	75	50
Reductive citrate cycle (Arnon-Buchanan cycle)	70	72.7	73	45.5	64	50	63.6	0	70	64	55	64	46	40	46	0	40	40	40	40	40	40
3-Hydroxypropionate bi-cycle	31	15.4	31	15.4	15	0	23.1	0	54	23	7.7	7.7	31	7.7	15	0	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
Hydroxypropionate-hydroxybutylate cycle	14	0	14	21.4	7.1	0	7.1	0	14	7.1	0	0	14	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
Dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle	39	38.5	62	23.1	39	15	46.2	0	31	46	31	31	15	7.7	23	7.7	7.7	15	7.7	7.7	7.7	7.7
Reductive acetyl-CoA pathway (Wood-Ljungdahl pathway)	29	28.6	29	28.6	43	57	28.6	0	43	29	43	29	14	14	14	0	14	14	14	14	14	14
Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway, acetyl-CoA => acetate	100	50	50	100	100	100	100	100	100	100	50	50	0	50	0	0	0	50	50	0	0	50
Incomplete reductive citrate cycle, acetyl-CoA => oxoglutarate	29	28.6	29	42.9	14	43	28.6	0	29	29	14	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 2. Mapa de calor de las vías metabólicas del de la fijación de carbono. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En relación a la asimilación de nitrógeno y azufre, la mayoría de los organismos no presentan indicios de actividad metabólica relacionada, sin embargo, en el caso del nitrógeno, *Bacillus subtilis*, *Nostoc* sp y *Leptothrix cholodnii* presentan alta actividad en reducción del nitrato a amonio, asimilación de amonio a partir de nitrógeno y nitrato, y procesos de asimilación y desasimilación de nitrógeno, respectivamente. *Clostridium* sp. BNL1100 relacionado a procesos de nitrificación y *Marinobacter* sp. BSs20148 en vías desnitrificantes; este último proceso se presenta de manera similar en *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331. *Calothrix* sp. PCC 7507, *C. variabilis*, *Penicillium digitatum* y *C. reinhardtii* presentan alto IFM de educación asimilatoria de nitrato. Todos los IFM mencionados en relación al metabolismo del nitrógeno son de 100. Tomando en cuenta el metabolismo del azufre, se presenta actividad de asimilación de azufre mediante la reducción de sulfato a ácido sulfhídrico; observándose lo anterior en *B. subtilis*, *Nostoc* sp., *Marinobacter* sp. BSs20148, *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331, *Calothrix* sp. PCC 7507, *P. digitatum*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Agaricus bisporus* var. *burnettii* JB137-S8 y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21; proponiendo una alta asimilación de azufre por acción fúngica (IFM= 100) (mapas 3 y 4).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	clb	Mbs	Psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	Cne
Nitrogen fixation, nitrogen => ammonia	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Assimilatory nitrate reduction, nitrate => ammonia	50	100	50	0	50	0	0	0	50	50	0	100	100	100	100	50	0	100	100	0	0	0
Dissimilatory nitrate reduction, nitrate => ammonia	100	0	100	0	50	0	50	0	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Denitrification, nitrate => nitrogen	25	0	100	0	0	0	100	0	75	100	0	0	25	0	25	0	0	25	0	0	0	0
Nitrification, ammonia => nitrite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Complete nitrification, comammox, ammonia => nitrite => nitrate	33	0	0	0	0	0	33.3	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 3. Mapa de calor de las vías metabólicas del nitrógeno. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	nos	lch	Marn	arz	clb	Mbs	Psol	Rhp	pae	ofo	Calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Assimilatory sulfate reduction, sulfate => H2S	100	100	33	0	67	67	100	0	67	100	0	100	67	100	67	0	100	100	100	0	100	100
Dissimilatory sulfate reduction, sulfate => H2S	33	33.3	33	0	33	0	33.3	0	33	0	0	33	33	33	33	33	33	33	33	0	33	33
Thiosulfate oxidation by SOX complex, thiosulfate => sulfate	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 4. Mapa de calor de las vías metabólicas del azufre. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Las rutas anfibólicas del metabolismo de ácidos grasos se presentan en todas las cepas, recalando que el IFM de la biosíntesis y elongación de estos, en mitocondria y retículo endoplásmico, es de 0 en todos los organismos procariontas (mapa 5).

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	mbs	Psol	Rhp	pae	Ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	Cne
Fatty acid biosynthesis, initiation	100	100	100	66.7	67	67	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	50	100
Fatty acid biosynthesis, elongation	100	100	100	100	50	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	25	100	100	100	100	50	100
Fatty acid biosynthesis, elongation, mitochondria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	50	33	33	33	75	50	100	25	75
Fatty acid biosynthesis, elongation, endoplasmic reticulum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	75	25	100	100	100	75	50	75
beta-Oxidation, acyl-CoA synthesis	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100
beta-Oxidation	75	0	75	0	75	0	100	0	50	100	0	0	100	75	100	67	67	100	75	100	75	100

Mapa 5. Mapa de calor de las vías metabólicas de ácidos grasos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Un punto importante en el metabolismo de otros lípidos, es la biosíntesis de ergocalciferol, ruta que presenta un IFM de 100 en *P. digitatum*, *C. albicans*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8 y *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21. En relación al metabolismo de lípidos de membrana, se observa una actividad alta mayormente marcada en los organismos eucariotas, destacando con un IFM de 100, la degradación de acilglicerol, la biosíntesis de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina (presentándose en procariotas la actividad homóloga a partir de la fosfatidilserina), biosíntesis de ceramidas, así como el metabolismo de la esfingosina (mapa 6).

	Bsu	Nos	lch	marn	Arz	clb	Mbs	psol	Rhp	Pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Ketone body biosynthesis, acetyl-CoA => acetoacetate/3-hydroxybutyrate/acetone	60	0	60	20	40	0	60	0	60	60	0	0	60	60	60	20	40	60	60	60	60	60
Triacylglycerol biosynthesis	50	50	50	50	25	50	75	50	50	50	50	50	75	75	50	25	50	75	75	50	50	50
Acylglycerol degradation	50	50	0	0	0	0	0	0	0	50	0	50	100	100	100	50	100	100	100	50	100	100
Phosphatidylcholine (PC) biosynthesis, choline => PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	67	0	33	67	67	67	67	67	67
Phosphatidylcholine (PC) biosynthesis, PE => PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	0	0	100	100	100	100	100	100
Phosphatidylethanolamine (PE) biosynthesis, ethanolamine => PE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	33	100	100	100	67	33	33
Phosphatidylethanolamine (PE) biosynthesis, PA => PS => PE	100	33.3	100	33.3	33	100	100	100	100	100	100	33	67	100	67	0	100	100	100	67	100	100
Ceramide biosynthesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	75	50	100	100	100	100	100	100
Lactosylceramide biosynthesis	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	50	0	50	0	0	50	50	50	50	50	50
Sulfoglycolipids biosynthesis, ceramide/1-alkyl-2-acylglycerol => sulfatide/seminolipid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sphingosine biosynthesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	100	100	80	40	80	100	100	80	100	80
Sphingosine degradation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100
Jasmonic acid biosynthesis	13	0	13	0	25	0	12.5	0	0	13	0	0	63	25	63	25	25	25	25	25	25	25

Mapa 6. Mapa de calor de las vías metabólicas de los lípidos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En relación al metabolismo de purinas, se observa una alta actividad (IFM= 100) en la biosíntesis de IMP, ATP y GTP.

De manera complementaria, se observa una alta actividad (IFM = 100) en la biosíntesis de dCTP y dTTP, a partir de UMP, vía biosintética también presente, con una menor actividad (IFM= 80-100) (mapas 7 y 8).

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	Mbs	psol	Rhp	pae	ofo	Calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	Cne
Inosine monophosphate biosynthesis, PRPP + glutamine => IMP	100	100	100	80	100	90	100	0	100	100	90	100	100	100	100	11	100	100	100	100	100	89
Adenine ribonucleotide biosynthesis, IMP => ADP,ATP	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100
Guanine ribonucleotide biosynthesis IMP => GDP,GTP	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100
Purine degradation, xanthine => urea	67	20	33	0	67	0	0	0	33	50	0	0	60	83	80	20	67	83	83	60	60	67

Mapa 7. Mapa de calor de las vías metabólicas de las purinas. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	Nos	Lch	marn	Arz	clb	mbs	psol	rhp	pae	ofo	Calo	cvr	Pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Uridine monophosphate biosynthesis, glutamine (+ PRPP) => UMP	83	83.3	83	83.3	83	67	83.3	0	83	83	83	83	67	100	80	67	100	100	100	100	100	100
Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis, UMP => UDP/UTP,CDP/CTP	100	100	67	100	100	67	100	67	100	100	100	100	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
Pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis, CDP/CTP => dCDP/dCTP,dTDP/dTTP	75	75	88	50	88	50	87.5	50	63	100	100	63	63	75	75	25	75	75	75	75	75	75
Pyrimidine degradation, uracil => beta-alanine, thymine => 3-aminoisobutanoate	0	0	100	33.3	100	0	100	0	100	100	33	0	100	0	100	0	0	0	33	0	0	33

Mapa 8. Mapa de calor de las vías metabólicas de las pirimidinas. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

El metabolismo de aminoácidos también se presentó al elucidar IFM de diversas vías metabólicas relacionadas. En el caso del metabolismo de la serina y treonina, la actividad de este último presenta un índice de 80-100, a excepción de *Candidatus P. solani* (organismo que presenta muy baja actividad en el metabolismo de aminoácidos) y *N. gaditana*.

En el caso de la biosíntesis de serina, estos dos organismos repiten en su baja actividad metabólica; y se suman *Nostoc* sp., *Marinitoga* sp. y *Calothrix* sp. PCC 7507; con un IFM < 33. El resto de las cepas analizadas presentan índices de 60-100 (mapa 9).

	Bsu	nos	Lch	marn	Arz	clb	Mbs	psol	rhp	Pae	ofo	Calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Serine biosynthesis, glycerate-3P => serine	67	33.3	100	33.3	100	67	100	0	100	100	67	33	100	100	100	33	100	100	100	67	67	67
Threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => threonine	100	100	100	60	100	80	100	0	80	100	100	100	100	100	100	20	100	100	100	100	80	100
Betaine biosynthesis, choline => betaine	100	0	50	0	50	0	100	0	50	100	0	50	0	50	50	50	0	50	50	0	50	0
Ectoine biosynthesis, aspartate => ectoine	40	60	40	40	40	40	80	0	40	60	40	40	40	40	40	0	40	40	40	40	40	40

Mapa 9. Mapa de calor de las vías metabólicas de serina y treonina. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

La síntesis de cisteína a partir de la serina presentó una actividad muy alta (IFM=100) en *B. subtilis*, *Nostoc* sp., *L. cholodnii*, *Arthrobacter* sp. ATCC 21022, *Clostridium* sp. BNL1100, *Marinobacter* sp. BSs20148, *Rhodobacter* sp., *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331, *O. formigenes*, *Calothrix* sp. PCC 7507, *C. variabilis* y *C. reinhardtii*.

B. subtilis presenta alta actividad metabólica en la síntesis de cisteína a partir de metionina, en la síntesis de metionina a partir de homoserina y en vías relacionadas al reciclaje de la metionina (IFM = 100).

La biosíntesis de cisteína a partir homocisteína y serina, se encuentra altamente activa en todos los hongos, a excepción de *P. digitatum*; fenómeno similar en el metabolismo de la metionina (IFM = 71-100) (mapa 10).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	clb	mbs	psol	Rhp	pae	ofc	calo	cvr	Pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
Cysteine biosynthesis, serine => cysteine	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	50	100	0	50	50	50	50	50	50	50
Cysteine biosynthesis, homocysteine + serine => cysteine	0	0	0	50	50	0	0	0	0	100	0	50	0	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100
Cysteine biosynthesis, methionine => cysteine	100	16.7	33	16.7	17	33	16.7	0	17	17	17	17	17	17	17	0	17	17	17	17	17	17	17
Methionine biosynthesis, apartate => homoserine => methionine	100	57.1	71	42.9	71	86	57.1	0	71	57	71	57	86	86	86	14	86	86	86	71	71	71	71
Methionine salvage pathway	100	50	33	50	13	44	12.5	0	38	89	50	60	67	89	78	38	100	89	100	78	78	89	89
Methionine degradation	50	75	50	75	100	75	50	0	75	75	50	100	75	100	75	0	75	100	100	100	100	100	75
Ethylene biosynthesis, methionine => ethylene	33	33.3	33	33.3	33	33	33.3	0	33	33	33	33	67	33	67	0	33	33	33	33	33	33	33

Mapa 10. Mapa de calor de las vías metabólicas de cisteína y metionina. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

La biosíntesis de isoleucina a partir de piruvato y treonina, y la biosíntesis de leucina con la producción previa de 2-oxoisocaproato presentan actividad metabólica con IGM de 70-100 en todas las cepas analizadas, a excepción de *Marinitoga* sp., *Candidatus P. solani* y *N. gaditana* (mapa 11).

	Bsu	Nos	Lch	marn	Arz	clb	mbs	psol	rhp	pae	ofc	calo	cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
Valine/isoleucine biosynthesis, pyruvate => valine / 2-oxobutanoate => isoleucine	100	75	100	25	100	100	100	0	100	100	100	75	100	100	100	25	100	100	100	75	100	100	100
Isoleucine biosynthesis, pyruvate => 2-oxobutanoate	67	66.7	67	33.3	67	67	66.7	0	67	67	67	67	33	33	67	0	33	33	33	33	33	33	33
Isoleucine biosynthesis, threonine => 2-oxobutanoate => isoleucine	100	80	100	20	100	80	100	0	100	100	100	80	100	100	100	40	100	100	100	80	100	100	100
Leucine biosynthesis, 2-oxoisovalerate => 2-oxoisocaproate	100	100	100	33.3	100	100	100	0	100	100	100	100	67	100	100	33	100	100	100	100	100	100	100
Leucine degradation, leucine => acetoacetate + acetyl-CoA	50	0	83	16.7	17	17	100	0	83	100	17	0	83	100	67	17	33	100	83	100	100	100	100

Mapa 11. Mapa de calor de las vías metabólicas de aminoácidos con cadena ramificada. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

La síntesis de lisina se mantiene activa (IFM = 67-100) en todos los microorganismos, son embargo, los hongos utilizan la vía del α -aminoadipato (IFM = 100), y el resto de los organismos, a excepción de *Candidatus P. solani* y *N. gaditana*, utilizan transaminasas y deshidrogenasas relacionadas al diaminopimelato (IFM = 67-100) (mapa 12).

	Bsu	nos	lch	marn	Arz	clb	mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Lysine biosynthesis, succinyl-DAP pathway, aspartate => lysine	89	77.8	100	77.8	100	78	100	11	100	100	100	78	67	22	67	0	22	33	33	22	22	33
Lysine biosynthesis, acetyl-DAP pathway, aspartate => lysine	100	66.7	67	77.8	67	67	66.7	0	67	67	67	67	67	22	67	0	22	33	33	22	22	33
Lysine biosynthesis, DAP dehydrogenase pathway, aspartate => lysine	83	83.3	83	83.3	83	100	100	0	83	83	100	83	83	33	83	0	33	50	50	33	33	50
Lysine biosynthesis, DAP aminotransferase pathway, aspartate => lysine	86	100	86	71.4	86	100	85.7	0	86	86	86	100	100	29	100	14	29	43	43	29	29	43
Lysine biosynthesis, AAA pathway, 2-oxoglutarate => 2-aminoadipate => lysine	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	100	0	13	100	100	100	75	88	100
Lysine biosynthesis, 2-oxoglutarate => 2-oxoadipate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	75	100	100
Lysine biosynthesis, mediated by LysW, 2-aminoadipate => lysine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lysine degradation, lysine => saccharopine => acetoacetyl-CoA	29	0	50	0	50	13	57.1	0	57	57	29	0	43	67	29	14	50	78	67	67	75	89

Mapa 12. Mapa de calor de las vías metabólicas de lisina. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

La síntesis de arginina, con la síntesis previa de ornitina a partir del ácido glutámico, está presente en la mayoría de los microorganismos analizados (IFM = 80-100 en la síntesis de ornitina; IFM = 67-100 en la síntesis de arginina); lo anterior no presentándose en *L. cholodnii*, *Candidatus F. solani* y *N. gaditana*. La síntesis de prolina presenta IFM de 100 en todas las cepas (a excepción de las ya mencionadas anteriormente); fenómeno similar en la actividad metabólica del ciclo de la urea (IFM = 40-80), marcando mayor actividad en los hongos, *B. subtilis*, *Rhodobacter* sp., y *O. formigenes*.

	Bsu	Nos	Lch	Marn	arz	Clb	mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Ornithine biosynthesis, glutamate => ornithine	100	100	100	25	100	100	80	0	100	100	80	100	100	100	100	20	100	100	100	100	100	100
Ornithine biosynthesis, mediated by LysW, glutamate => ornithine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginine biosynthesis, ornithine => arginine	100	100	67	33.3	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100
Arginine biosynthesis, glutamate => acetylcitrulline => arginine	71	57.1	57	14.3	71	57	57.1	0	71	71	43	57	43	43	57	29	29	43	43	29	29	29
Urea cycle	80	60	60	20	60	60	60	0	80	60	80	60	60	80	60	40	80	80	80	80	80	80
Proline biosynthesis, glutamate => proline	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100
Creatine pathway	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 13. Mapa de calor de las vías metabólicas de arginina y prolina. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Aunado a esto, Se observa que la biosíntesis de histidina a partir de fosforribosilamina se presenta con un índice de 100 en todas las cepas, a excepción *Marinitoga* sp, *Candidatus P. solani* y *N. gaditana* (mapas 13 y 14).

	Bsu	nos	lch	Marn	arz	Clb	mbs	psol	rhp	Pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Histidine biosynthesis, PRPP => histidine	100	87.5	89	0	100	100	88.9	0	89	89	89	88	100	100	88	14	100	100	100	100	86	100
Histidine degradation, histidine => N-formiminoglutamate => glutamate	100	0	0	0	100	0	25	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 14. Mapa de calor de las vías metabólicas de histidina. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En relación a los aminoácidos aromáticos, la vía de biosíntesis de triptófano a partir de corismato presenta IFM= 80-100 en la mayoría de las cepas, a excepción de *Marinitoga* sp., *Candidatus F. solani* y *N. gaditana*. Teniendo en cuenta la biosíntesis de fenilalanina, esta se encuentra presente en todas las cepas a excepción de *Candidatus P. solani*, presentando IFM con un rango más amplio, valores que van desde 33.3 (*Marinitoga* sp.)- 100 (*Rhodobacter* sp. y *O. formigenes*). En el caso de la síntesis de tirosina, *L. cholodnii* y *O. formigenes* presentan IFM de 100, mayores al resto, que presentan IFM entre 33.3-67 (mapa 15).

	Bsu	Nos	Lch	marn	arz	clb	mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Shikimate pathway, phosphoenolpyruvate + erythrose-4P => chorismate	100	100	100	85.7	100	100	85.7	0	100	86	100	100	100	100	100	20	100	100	100	100	100	100
Tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan	80	100	100	0	80	100	100	0	100	100	100	100	100	100	80	25	100	100	100	100	100	100
Phenylalanine biosynthesis, chorismate => phenylalanine	67	66.7	100	33.3	67	67	50	0	100	100	100	67	33	100	67	50	100	100	100	67	67	67
Tyrosine biosynthesis, chorismate => tyrosine	67	33.3	100	33.3	67	67	33.3	0	67	67	100	33	33	67	33	50	67	67	67	33	67	67
Tyrosine biosynthesis, prephanate => pretyrosine => tyrosine	0	50	50	0	0	0	0	0	100	50	50	50	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Catecholamine biosynthesis, tyrosine => dopamine => noradrenaline => adrenaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	25	0	0	50	50	25	50	25
Thyroid hormone biosynthesis, tyrosine => triiodothyronine/thyroxine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyrosine degradation, tyrosine => homogentisate	0	20	80	0	20	0	0	0	0	80	0	20	60	60	60	20	20	80	60	20	20	0
Homoprotocatechuate degradation, homoprotocatechuate => 2-oxohept-3-enedioate	0	0	25	0	25	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trans-cinnamate degradation, trans-cinnamate => acetyl-CoA	0	0	17	0	83	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melatonin biosynthesis, tryptophan => serotonin => melatonin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	25	50	0	0	25	25	0	25	25
Tryptophan metabolism, tryptophan => kynurenine => 2-aminomuconate	0	14.3	29	0	71	0	0	0	0	43	0	0	29	57	14	0	71	71	57	71	57	43

Mapa 15. Mapa de calor de las vías metabólicas de los aminoácidos aromáticos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos), (IFM siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Se reporta actividad metabólica enfocada a la biosíntesis de vitaminas y cofactores (mapa 16), observándose producción en la mayoría de las cepas de rivo flavina a partir de la hidrólisis de GTP (IFM= 57- 100); a excepción de *Candidatus P. solani* (IFM = 14) y *N. gaditana* (IFM = 38), donde la actividad es considerablemente menor. En relación a lo observado en la tiamina, *Marinitoga* sp. (IFM = 20), *Candidatus P. solani* (IFM= 0) y *Nannochloropsis gaditana* (IFM= 0) son los que presentan menor actividad de biosíntesis; *C. variabilis* y *A. alternata* reportan un IFM = 40; y el resto de las cepas presentan IFM= 60-100. La producción de ácido pantoténico es más baja en *Candidatus P. solani* (IFM =

0) y *N. gaditana* (IFM = 20); *C. variabilis*, *N. gaditana*, *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8 y *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 presentan IFM = 60. El resto de las cepas presentan mayor actividad biosintética a las antes mencionadas (IFM= 80-100). La biosíntesis de biotina se presenta por tres vías metabólicas:

a) usando pimeloil- ACP/CoA;

b) usando como precursores grupos acilo de cadena larga, y

c) usando como precursor el pimelato, donde se observa que *B. subtilis* utilizan las tres para la síntesis de dicha molécula (IFM = 100, 100 y 100).

L.cholodnii, *Marinobacter* sp. BSs20148, *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331 y *O. formigenes* también utilizan las tres rutas, usando la primera en mayor medida (IFM= 100, 80 y 80).

En relación a la biosíntesis de cofactores, *N. gaditana* y *Candidatus P. solani* presentan menor producción de NAD (IFM= 20); en el caso de los hongos, estos presentan in IFM = 60, y el resto de las cepas biosintetizan el NAD con un IFM de 100. A excepción de *Marinitoga* sp. (IFM= 40), *Candidatus P. solani* (IFM = 20) y *N. gaditana* (IFM = 20), el resto de las cepas utiliza la vía de biosíntesis de tetrahidrofolato, utilizando ATP, presentando un IFM mayor (67-100).

Con relación a grupos prostéticos, se observa la actividad biosintética de grupo hemo en todas las cepas (IFM = 70-100), a excepción de *Marinitoga* sp. (IFM= 10), *Candidatus P. solani* (IFM = 0), *O. formigenes* (IFM = 20) y *N. gaditana* (IFM= 30). De manera complementaria, la biosíntesis del grupo sirohemo se comportó de manera similar, donde las cepas antes mencionadas presentan IFM de 14.3, 0 y 0, respectivamente; *O. formigenes* (IFM = 29), *P. graminis* (IFM = 43) y *P. digitatum* (IFM = 57); el resto de las cepas presentaron IFM en el rango 71-100 (mapa 16).

	Bsu	nos	lch	Marn	Arz	clb	mbs	psol	rhp	Pae	ofo	calo	Cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
Thiamine biosynthesis, AIR => thiamine-P/thiamine-2P	100	80	100	20	80	80	60	0	60	80	100	80	80	60	40	0	60	60	40	60	60	60	
Riboflavin biosynthesis, GTP => riboflavin/FMN/FAD	100	85.7	100	85.7	57	86	85.7	14	86	100	86	86	88	75	100	38	75	63	63	75	75	63	
Pyridoxal biosynthesis, erythrose-4P => pyridoxal-5P	17	50	67	0	17	17	100	0	67	100	50	50	33	33	33	17	33	33	33	33	33	17	
NAD biosynthesis, aspartate => NAD	100	100	100	80	100	100	100	20	100	100	100	100	80	60	100	20	60	60	60	60	60	60	
Nicotinate degradation, nicotinate => fumarate	0	0	0	0	17	0	16.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pantothenate biosynthesis, valine/L-aspartate => pantothenate	100	80	100	80	80	80	80	0	80	100	100	80	60	80	60	20	80	80	80	80	80	60	60
Coenzyme A biosynthesis, pantothenate => CoA	100	100	100	75	100	100	100	0	100	100	100	100	75	80	100	50	100	80	80	100	80	80	
Pimeloyl-ACP biosynthesis, BioC-BioH pathway, malonyl-ACP => pimeloyl-ACP	67	66.7	83	50	33	50	100	0	67	100	100	67	67	33	67	17	33	33	33	17	17	0	
Biotin biosynthesis, pimeloyl-ACP/CoA => biotin	100	75	100	33.3	33	33	100	0	0	100	100	75	100	100	100	0	50	100	100	67	100	100	
Biotin biosynthesis, BioI pathway, long-chain-acyl-ACP => pimeloyl-ACP => biotin	100	60	80	20	20	20	80	0	0	80	80	60	40	40	40	0	40	40	40	20	40	40	
Biotin biosynthesis, BioW pathway, pimelate => pimeloyl-CoA => biotin	100	60	80	20	20	20	80	0	0	80	80	60	40	40	40	0	40	40	40	20	40	40	
Tetrahydrofolate biosynthesis, GTP => THF	100	85.7	100	40	100	71	85.7	20	71	100	100	86	83	83	67	20	100	83	83	67	80	100	
Tetrahydrofolate biosynthesis, mediated by ribA and trpF, GTP => THF	50	33.3	50	16.7	33	33	50	17	33	50	50	33	50	33	33	17	17	33	33	33	0	17	
Tetrahydrofolate biosynthesis, mediated by PTPS, GTP => THF	67	66.7	67	16.7	67	67	66.7	0	67	67	50	67	33	17	17	0	17	17	17	17	17	17	
Tetrahydrobiopterin biosynthesis, GTP => BH4	67	66.7	33	0	33	67	33.3	0	33	67	33	67	33	33	0	0	33	33	33	33	33	33	
L-threo-Tetrahydrobiopterin biosynthesis, GTP => L-threo-BH4	67	66.7	33	0	33	67	33.3	0	33	67	33	67	33	33	0	0	33	33	33	33	33	33	
C1-unit interconversion, prokaryotes	67	66.7	67	100	100	100	66.7	33	100	67	100	67	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	
C1-unit interconversion, eukaryotes	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	100	50	50	100	100	100	100	100	100	
Heme biosynthesis, glutamate => heme	80	90	90	10	90	70	90	0	80	90	20	90	100	70	100	30	80	90	90	70	80	90	
Siroheme biosynthesis, glutamate => siroheme	86	85.7	86	14.3	100	86	100	0	71	100	29	86	86	57	86	0	71	86	86	43	71	86	
Heme biosynthesis, archaea, siroheme => heme	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cobalamin biosynthesis, cobinamide => cobalamin	14	71.4	100	28.6	0	86	100	0	100	100	29	71	14	0	14	0	0	0	0	0	0	0	
Ubiquinone biosynthesis, prokaryotes, chorismate => ubiquinone	11	55.6	67	0	11	22	100	0	56	89	56	56	0	22	11	0	0	0	0	22	22	22	
Ubiquinone biosynthesis, eukaryotes, 4-hydroxybenzoate => ubiquinone	0	0	17	0	0	0	16.7	0	0	17	0	0	67	67	50	17	100	67	67	33	50	67	

Menaquinone biosynthesis, chorismate => menaquinone	89	100	22	0	78	0	22.2	0	22	22	11	100	22	0	33	0	0	0	0	0	0	0
Tocopherol/tocotorienol biosynthesis	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	25	0	0	0	0

Mapa 16. Mapa de calor de las vías metabólicas de las vitaminas y cofactores. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Analizando los complejos fisiológicos se observa la actividad de los fotosistemas participantes en el proceso de fotosíntesis, encontrando actividad fisiológica en los fotosistemas I y II, en *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. PCC 7507, *C. variabilis* y *C. reinhardtii* (IFM = 100), y ausencia de la actividad fisiológica en el resto de las cepas (mapa 17).

	Bsu	Nos	Lch	Marn	Arz	Clb	mbs	psol	Rhp	pae	ofa	calo	Cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Photosystem II	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Photosystem I	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 17. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la fotosíntesis. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En relación al funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, se observó actividad en los diversos complejos de la misma, encontrando actividad fisiológica activa en los complejos homólogos entre eucariotas y procariotas. En relación al complejo I, los procariotas recurren principalmente a NADH quinona oxidoreductasa, encontrando este complejo en bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas, siendo el caso de las primeras *Nostoc* sp y *Calothrix* sp. PCC 7507; y *L. cholodnii*, *Rhodobacter* sp., *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331 y *O. formigenes* (microorganismos con IFM = 100); en el caso de *Marinitoga* sp. (IFM= 57) y *Clostridium* sp. BNL1100 (IFM = 27), presentan menor actividad de recepción de electrones en el complejo I.

Los organismos eucariotas recurren a 4 complejos de actividad deshidrogenasa de NADH, ubiquinona oxidoreductasa, tres deshidrogenasas (complejo flavoproteína Fe-S; subcomplejo alfa y subcomplejo beta); presentando mayor actividad en el complejo flavoproteína Fe-S (IFM= 90-100). En relación al complejo II, la actividad succinato deshidrogenasa, relacionada a la aceptación de electrones

del FADH elaborado durante el ciclo de Krebs, se presenta en la mayoría de los organismos procariotas (IFM= 50- 100), a excepción de *Marinitoga* sp., *Clostridium* sp. BNL1100, *Candidatus P. solani* y *O. formigenes* (IFM = 0).

Para el caso de los eucariotas, se presentó un IFM = 75-100 en el complejo ubiquinona succinato deshidrogenasa, a excepción de *N. gaditana* (IFM = 0). En el complejo III, la actividad del citocromo b-c 1 presentó un IFM = 60-100 en los diversos organismos reportados, a excepción de *Nostoc* sp., *Marinitoga* sp., *Clostridium* sp. BNL1100, *Candidatus F. solani*, *O. formigenes*, *Calothrix* sp. PCC 7507 y *N. gaditana*. En relación al complejo IV, la enzima citocromo C oxidasa presenta homología en funciones entre procariotas y eucariotas, donde se observa un rango del IFM= 53- 73 en organismos eucariotas, a excepción de *N. gaditana* (IFM= 0). En el caso de los organismos procariotas, presentan un IFM= 100, a excepción de *Marinitoga* sp., *Clostridium* sp. BNL1100, *Candidatus P. solani*, *Rhodobacter* sp. y *O. formigenes*. La actividad del complejo V, correspondiente a la síntesis de ATP, la ATPasa tipo F, presente en procariotas y cloroplastos, presenta IFM = 100 en organismos procariotas y microalgas, a excepción de *Candidatus P. solani* (IFM = 0). Los organismos eucariotas recurren a dos tipos de ATPasa de manera simultánea, la tipo F y la tipo V, encontrándose un IFM = 47-100; a excepción de *N. gaditana*, que presentó un IFM = 7.7-20 en ambos tipos de ATPasa (mapa 18).

	Bsu	nos	Ich	marn	Arz	Clb	mbs	psol	Rhp	Pae	ofo	calo	cvr	Pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
NADH:quinone oxidoreductase, prokaryotes	0	0	100	57	0	27	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NAD(P)H:quinone oxidoreductase, chloroplasts and cyanobacteria	9.1	100	0	0	0	0	9.1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NADH:ubiquinone oxidoreductase, mitochondria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	86	0	100	0	0	0	57	0
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein/ flavoprotein complex, mitochondria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	90	10	100	90	100	100	100	100
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	43	57	14	43	43	36	57	57	64
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	31	23	7.7	31	31	31	23	31	15
Succinate dehydrogenase, prokaryotes	75	75	100	0	100	0	100	0	100	100	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fumarate reductase, prokaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	100	0	100	100	100	75	100	100
Cytochrome b6f complex	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	75	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Cytochrome bc1 complex respiratory unit	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0	0	100	67	100	0	67	67	67	67	67	67
Cytochrome bc1 complex	0	0	30	0	0	0	30	0	30	30	0	0	60	70	60	0	90	70	60	60	60	70
Cytochrome c oxidase	13.3	13	20	0	13	0	13	0	6.7	20	0	13	60	73	53	0	87	67	73	73	73	73
Cytochrome c oxidase, prokaryotes	100	100	100	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytochrome bd ubiquinol oxidase	66.7	67	0	0	67	0	67	0	100	67	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytochrome o ubiquinol oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytochrome c oxidase, cbb3-type	0	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-type ATPase, prokaryotes and chloroplasts	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0
F-type ATPase, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	80	47	20	100	87	87	80	87	80
V/A-type ATPase, prokaryotes	0	0	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-type ATPase, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	85	85	7.7	92	92	92	92	69	85

Mapa 18. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ATP. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Con relación a la actividad genética, se observa la actividad del complejo III de la polimerasa de ADN, característico de procariotas (IFM= 83- 100), en la totalidad de los organismos pertenecientes a este grupo. En cambio, en el caso de los organismos eucariotas, se observa la actividad de diversos complejos presentes dentro del cúmulo de proteínas polimerasas, siendo los complejos alfa y zeta los que mayor actividad presentan; sin embargo, se sugiere una actividad conjunta de los complejos alfa, delta, épsilon, zeta y gamma, siendo este último el que presenta menor actividad (IFM= 50- 100) (mapa 19).

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	Mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
DNA polymerase III complex, bacteria	100	83	100	83	100	100	100	100	100	100	100	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DNA polymerase II complex, archaea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DNA polymerase alpha / primase complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100
DNA polymerase delta complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	75	75	50	75	100	100	75	100	75	75
DNA polymerase epsilon complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	50	75	25	100	50	50	100	75	75	75
DNA polymerase zeta complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	50	50	100	100	100	100	100	100	50
DNA polymerase gamma complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	50	50	50	50	50	50	50

Mapa 19. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ADN. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	mbs	psol	Rhp	Pae	Ofo	calo	Cvr	pdp	Cre	Ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Origin recognition complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	50	17	100	100	100	83	83	67
MCM (helicase) complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	17	100	100	100	100	100	100
GINS complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	75	25	100	100	100	100	100	50
RPA complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	67	67	0	100	67	100	100	100	100
RF-C complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	100	100	33	100	100	100	100	100	100
Shelterin complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 20. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del proceso de replicación del ADN. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	nos	Lch	marn	Arz	clb	Mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
BER complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	60	20	40	20	60	60	20	40	40
Holo-TFIIH complex	0	10	0	0	10	0	10	0	0	0	0	10	90	90	70	20	100	100	100	100	100	100
MRN complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	67	67	0	67	67	67	67	33	67
MRX complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	67	67	0	67	67	67	67	33	67
DNA-PK complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	67	67	0	67	67	67	67	67	67
BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	79	71	21	86	86	86	86	79	86
FA core complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Bloom's syndrome complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	25	50	50	50	75	75	75

Mapa 21. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la reparación del ADN. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

El procesamiento del ARN también se propone mediante el análisis de la actividad de estos complejos. La actividad de la ARN polimerasa bacteriana presentó índices entre 75-100, con la particularidad que *C. reinhardtii* y *C. variabilis* presentan un IFM = 75, siendo que estos organismos pertenecen al dominio eukarya; sugiriendo una potencial relación simbiótica con organismos procariontes.

Para el caso de los eucariotas, la actividad de las polimerasas I, II y III estaba presente en todos los organismos analizados (IFM = 81-100), a excepción de *N. gaditana* (IFM = 17-38) (mapa 22).

	Bsu	Nos	lch	marn	arz	clb	mbs	Psol	rhp	pae	Ofo	calo	Cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	Abp	cne	
RNA polymerase, bacteria	100	100	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	75	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0
RNA polymerase, archaea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RNA polymerase II, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	100	92	25	100	100	100	92	83	83	83
RNA polymerase III, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	94	88	38	100	88	100	81	94	94	94
RNA polymerase I, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	83	17	100	100	100	100	83	83	92

Mapa 22. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la síntesis de ARN. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En el caso del proceso de edición del ARN inmaduro, hasta su maduración en ARNm recurre a una serie de complejos proteicos los que se presentan activos en los organismos eucariotas (IFM = 71-100), a excepción de los observado en *N. gaditana*, con índices que no son superiores a 44 (mapa 23).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	Clb	mbs	psol	Rhp	Pae	ofo	calo	Cvr	Pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
Spliceosome, U1-snRNP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	90	80	10	90	90	90	100	70	90	90
Spliceosome, U2-snRNP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	90	95	30	90	90	90	85	80	90	90
Spliceosome, U4/U6.U5 tri-snRNP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	97	87	23	90	100	100	100	87	100	100
Spliceosome, 35S U5-snRNP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	97	90	45	71	97	97	90	87	90	90
Spliceosome, Prp19/CDC5L complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89	78	78	44	56	78	78	89	78	78	78
Lsm 2-8 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	86	100	14	100	100	100	100	100	100	100
Lsm 1-7 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	86	100	14	100	100	100	100	86	100	100
Sm core complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	100	86	14	100	100	100	100	71	100	100
Cap binding complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100

Mapa 23. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del procesamiento y maduración del ARN. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Como resultado del procesamiento de las proteínas, se establecen mecanismos conjuntos que van desde el proceso de señalización proteica, hasta su incorporación en la membrana, ya sea para la integración de sus componentes en la misma, o la secreción de residuos proteicos, como producto del proceso de recambio de las proteínas. Para esto, diversos complejos se hacen presentes en los organismos eucariotas, con IFM = 70-100 en la mayoría de los complejos usados en la actividad del proteasomas, señalización por medio de ubiquitinación y el procesamiento de incorporación a la membrana (complejos ESCRT-0 al III) (mapas 24, 25 y 26).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	Clb	mbs	psol	rhp	pae	Ofo	calo	Cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Ribosome, bacteria	100	98	100	100	100	100	94	96	98	100	96	98	75	40	65	14	56	58	54	56	44	58
Ribosome, archaea	53.4	52	53	53	53	53	52	53	53	53	53	52	76	59	76	14	79	78	72	78	60	76
Ribosome, eukaryotes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	84	100	27	99	99	96	96	88	96

Mapa 24. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la actividad ribosomal. El mapa expresa el IFM (índice de finalización de módulos), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	nos	lch	marn	arz	clb	mbs	psol	rhp	Pae	ofo	calo	cvr	pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	Pgr	abp	cne	
Proteasome, 20S core particle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100
Proteasome, 19S regulatory particle (PA700)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	95	11	95	100	100	100	100	100	100
Immunoproteasome	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63	69	69	31	69	69	69	75	69	69	69
Bacterial proteasome	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Archaeal proteasome	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 25. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de la degradación de proteínas. El mapa expresa el IFM (índice de finalización de módulos), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

	Bsu	nos	Lch	marn	arz	clb	Mbs	psol	Rhp	pae	Ofo	calo	cvr	Pdp	Cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	Abp	cne	
SCF-MET30 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	75	25	100	100	100	100	100	100	100
SCF-BTRC complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	75	25	75	100	100	100	100	100	75
SCF-SKP2 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	75	75	25	75	75	75	75	75	75	75
SCF-FBS complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	75	75	25	75	75	75	75	75	75	75
SCF-CDC4 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	75	25	100	100	100	100	100	100	100
SCF-GRR1 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	100	75	25	100	100	100	100	100	100	100
ECV complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	40	60	40	40	40	40	40	40	40	40
Cul3-SPOP complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	67	100	33	67	100	67	67	67	67	67
Cul4-DDB1-DDB2 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	50	75	25	50	75	75	75	75	75	50
Cul4-DDB1-CSA complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	75	100	25	75	100	100	75	75	75	50
SCF-FBW7 complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	75	100	25	75	75	75	75	75	75	75
APC/C complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	83	58	33	83	83	92	58	83	67	67

Mapa 26. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del sistema de señalamiento molecular por ubiquitinación. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Aunado a las vías descritas con anterioridad, también se observan vías y complejos con actividad de asimilación y transporte de sustancias, algunas de ellas relacionadas a iones, compuestos orgánicos y biomoléculas presentes en el medio ambiente, que pueden ser incorporados al metabolismo celular.

El transporte de iones minerales y orgánicos, *B. subtilis* utiliza sistemas de transporte relacionados a la movilización de molibdato, sulfonato, glicina-prolina y sistema de transporte osmoprotectante, relacionado al equilibrio osmótico celular (IFM = 67-100).

Nostoc sp. recurre a sistemas celulares de transporte de sulfato, molibdato, nitrato/nitrito y bicarbonato; sistemas de transporte para la incorporación de sulfonato y tiamina también presentan actividad, al igual que es sistema osmoprotector (IFM = 75-100).

L. cholodnii recurre a sistemas de transporte de sulfato, molibdato, tungstato, nitrato/nitrito, nitrato/taurina y Fe (III); en el caso de los iones orgánicos, se observa actividad en el sistema de transporte de putrescina y tiamina (IFM = 100).

Marinitoga sp presenta marcada actividad en el sistema de transporte de Fe (III) (IFM = 100).

Arthrobacter sp. ATCC 21022 presentó, de manera muy similar a lo observado en *B. subtilis*, actividad en sistemas de transporte similares, incluyendo la actividad de transporte de Fe (III) y putrescina (IFM = 100).

Clostridium sp. BNL1100 recurre activamente al transporte de molibdato, sulfato, nitrato/taurina y putrescina (IFM = 100).

Marinobacter sp. BSs20148 presenta índices de 75-100 en la actividad de sistemas de transporte de sulfato, molibdato, tungstato, nitrato/nitrito, nitrato/taurina, Fe (III), tiamina, sistemas relacionados al transporte de putrescina y glicina/prolina.

Rhodobacter sp., se comportó de una manera similar a *Marinobacter* sp. BSs20148 (IFM = 67-100), con la diferencia de no reportarse actividad en el sistema de transporte de tungstato y presentar una actividad menor (IFM = 66) en el sistema de transporte putativo de tiamina.

Paenibacillus sp. FSL R7-0331 prescinde de los sistemas de transporte de nitrato/nitrito y tiamina, esto en relación a la actividad de *Rhodobacter* sp. (IFM = 100).

O. formigenes transporta activamente iones de molibdato (IFM = 100) y, en menor medida, nitrato/taurina (IFM = 67). *Calothrix* sp. PCC 7507 presenta una actividad muy similar a la de *Nostoc* sp., prescindiendo de la actividad del sistema de transporte de tiamina. *C. variabilis* y *C. reinhardtii* presentan un IFM= 100 para el sistema de transporte de sulfato (mapa 27).

	Bsu	nos	Lch	marn	Arz	Clb	mbs	psol	rhp	Pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Sulfate transport system	0	100	100	0	0	100	75	0	100	100	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Molybdate transport system	66.7	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Molybdate/tungstate transport system	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tungstate transport system	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrate/nitrite transport system	0	100	100	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bicarbonate transport system	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NitT/TauT family transport system	66.7	67	100	33	100	100	100	0	100	100	67	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Taurine transport system	0	0	0	0	0	0	67	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfonate transport system	100	100	0	0	33	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phthalate transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iron(III) transport system	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thiamine transport system	0	0	0	67	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spermidine/putrescine transport system	0	75	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putrescine transport system	0	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative spermidine/putrescine transport system	0	25	100	0	100	0	100	0	100	100	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannopine transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoethylphosphonate transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycine betaine/proline transport system	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osmoprotectant transport system	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative thiamine transport system	0	0	100	0	0	0	100	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 27. Mapa de calor de los complejos fisiológicos de transporte de iones minerales y orgánicos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Los microorganismos analizados presentan actividad de transporte de sacáridos, polioles y lípidos, donde se observa que las cepas transportan, de manera aislada algunas de las moléculas antes mencionadas; sin embargo, *B. subtilis*, *Nostoc* sp., *L. cholodnii*, *Marinitoga* sp., *Arthrobacter* sp. ATCC 21022, *Clostridium* sp. BNL1100, *Marinobacter* sp. BSs20148 y *Calothrix* sp. PCC 7507 presentaron índices de 100 en la actividad del sistema putativo de transporte de múltiples azúcares y azúcares simples, incluyendo a *Rhodobacter* sp. y *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331 en relación a este último sistema.

En menor medida, se observó la actividad del sistema de transporte de gama-hexaclorociclohexano, el de fosfolípidos y el de transporte de moléculas hidrofóbicas (IFM = 60-100), presentándose en *Nostoc* sp., *L. cholodnii*, *Marinobacter* sp. BSs20148, *Rhodobacter* sp., *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331, *O. formigenes* y *Calothrix* sp. PCC 7507 (mapa 28).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	Clb	mbs	psol	Rhp	Pae	Ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Maltose/maltodextrin transport system	25	25	25	100	25	25	0	25	25	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Raffinose/stachyose/melibiose transport system	100	25	25	25	100	100	0	25	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
alpha-Glucoside transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose/mannose transport system	25	25	100	100	25	25	0	25	0	100	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trehalose/maltose transport system	0	0	100	0	25	0	0	0	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetylglucosamine transport system	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cellobiose transport system	25	25	25	25	25	75	0	25	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N,N'-Diacetylchitobiose transport system	25	25	25	25	25	25	0	25	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative chitobiose transport system	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative aldouronate transport system	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Xylose transport system	0	0	67	0	0	33	0	0	100	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Multiple sugar transport system	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fructose transport system	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhamnose transport system	0	0	100	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ribose transport system	100	100	33	0	100	33	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative xylitol transport system	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol transport system	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative fructooligosaccharide transport system	25	25	25	25	25	25	0	25	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycerol transport system	0	0	0	0	0	0	80	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative sn-glycerol-phosphate transport system	0	0	0	75	75	75	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative sorbitol/mannitol transport system	25	25	100	25	50	25	0	25	100	100	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arabinosaccharide transport system	100	25	25	25	25	25	0	25	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gamma-Hexachlorocyclohexane transport system	0	75	75	0	0	0	100	0	75	100	100	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phospholipid transport system	0	60	100	0	0	0	100	0	80	100	100	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mce transport system	0	75	75	0	0	0	75	0	75	75	75	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
arabinogalactan oligomer/maltooligosaccharide transport system	100	25	25	25	25	25	0	25	25	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative multiple sugar transport system	100	100	100	100	100	100	0	100	25	25	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative simple sugar transport system	66.7	67	100	67	100	100	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative ABC transport system	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 28. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del transporte de sacáridos, polióles y lípidos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

Se observó que la actividad bacteriana en el transporte de diversos tipos de aminoácidos, entre los que se encuentran encendidas las vías relacionadas al sistema de transporte de aminoácidos polares (IFM= 33-100), transporte de aminoácidos de cadenas ramificadas (IFM = 80-100), transporte de D-metionina (IFM =33-100), siendo los sistemas activos en la mayoría de las cepas bacterianas. En menor medida, se observó el índice del transporte de cisteína y L-cisteína en *B. subtilis* (IFM = 100), y del transporte general de L aminoácidos en *Nostoc* sp., *L. cholodnii*, *Marinobacter* sp. BSs20148, *Rhodobacter* sp., *Calothrix* sp. PCC 7507 (IFM = 100). En la mayoría de las bacterias analizadas se observó actividad de los sistemas de transporte de fosfato de manera muy activa (IFM = 100), a excepción de *Candidatus P. solani* (mapa 29).

	Bsu	nos	lch	marn	arz	clb	Mbs	psol	rhp	pae	ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne	
Phosphate transport system	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phosphonate transport system	0	100	100	0	0	0	100	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lysine/arginine/ornithine transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Histidine transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glutamine transport system	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glutamate/aspartate transport system	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
General L-amino acid transport system	0	100	100	0	0	0	100	0	100	25	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glutamate transport system	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cystine transport system	100	0	0	0	100	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Cystine transport system	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginine/ornithine transport system	0	0	0	0	0	0	75	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginine/lysine/histidine/glutamine transport system	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative lysine transport system	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Branched-chain amino acid transport system	0	0	100	80	100	0	100	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutral amino acid transport system	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urea transport system	0	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Methionine transport system	100	33	0	100	0	100	100	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative glutamine transport system	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative amino-acid transport system	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative polar amino acid transport system	100	33	100	100	100	100	100	67	100	100	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 29. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del sistema de transporte de fosfato y aminoácidos. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

En el caso de los iones metálicos (mapa 30) se observó actividad relacionada al transporte de iones de hierro es el más utilizado, solo *Candidatus F. solani* no presenta actividad de este complejo (IFM = 100).

El transporte de zinc también presentó actividad en los organismos procariotas, a excepción de cuatro cepas (IFM = 100) (*Nostoc* sp., *L. cholodnii*, *Arthrobacter* sp. ATCC 21022 y *Candidatus P. solani*).

Para el caso de níquel y cobalto, el transporte de éstos inones fue activo (IFM = 75-100) en las mismas cepas (*Nostoc* sp., *Clostridium* sp. BNL1100, *Marinobacter* sp. BSs20148, *Rhodobacter* sp. y *Calothrix* sp. PCC 7507).

	Bsu	nos	Lch	Marn	arz	clb	mbs	psol	Rhp	pae	Ofo	calo	cvr	pdp	cre	ngd	cal	fox	aalt	pgr	abp	cne
Iron complex transport system	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamin B12 transport system	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manganese transport system	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zinc transport system	100	0	0	100	0	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manganese/zinc/iron transport system	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manganese/iron transport system	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cobalt/nickel transport system	0	100	0	0	0	100	100	0	100	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nickel transport system	0	100	0	0	0	100	100	0	100	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biotin transport system	33.3	33	0	33	100	33	0	0	33	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Energy-coupling factor transport system	100	100	0	100	100	100	0	100	25	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative zinc/manganese transport system	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putative ABC transport system	0	0	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mapa 30. Mapa de calor de los complejos fisiológicos del sistema de transporte de cationes metálicos, sideróforos de Fe y vitamina B12. El mapa expresa el índice de finalización de módulos (IFM), siendo el color rojo indicador de mayor actividad, mientras que el color amarillo es el de menor actividad.

7.3 Actividad remediadora de las cepas evaluadas de manera individual

Se evaluaron distintos parámetros fisicoquímicos en el agua para evaluar la efectividad remediadora de las cepas participantes en el estudio (Tabla 1). La conductividad se relaciona con la presencia de solutos que funcionan como electrolitos, permitiendo conducir la electricidad; por lo tanto, la asimilación de sales procedentes del agua residual permite la reducción de la conductividad. Ambas microalgas cultivadas bajo luz y agitación de manera simultánea, y solo bajo condiciones de luz, presentan una menor cantidad de mS (*C. vulgaris* L = 1.41; *C. sorokiniana* con luz = 1.41; *C. sorokiniana* con luz y agitación = 1.45; *C. vulgaris* con luz y agitación = 1.48), resultados correspondientes a una mayor asimilación de sales; siendo estos significativamente menores a los mS determinados en el agua tratada con *B. subtilis* (2.1333). El T0, correspondiente a la determinación previa al inicio del bioproceso, presentó 2.2 mS, valor significativamente mayor a la de los tratamientos antes mencionados.

Se reconoce a la turbidez como un parámetro que indica la cantidad de materia orgánica disuelta y suspendida en el agua a tratar, por lo que niveles bajos de este parámetro indican una potencial asimilación y remoción de los contaminantes del agua. Se presentó una disminución significativa de la turbidez en todos los tratamientos, esto con relación a la determinación previa al tratamiento del agua (T0 = 115 FTU). El agua tratada con *C. vulgaris* bajo condiciones de luz (2.6 FTU) mostró una mayor efectividad en la asimilación de los sólidos disueltos en el agua; fenómeno no observado al analizar el agua tratada con la misma microalga, en condiciones de agitación, y ambas a la vez, donde se presentaron los mayores niveles de turbidez (*C. vulgaris* con luz y agitación = 17.6; *C. vulgaris* con agitación = 20.98), no presentando diferencias entre dichos tratamientos. Los tratamientos mencionados fueron menores significativamente al T0.

El pH del agua residual es un parámetro que permite entender el efecto de los iones sobre los procesos biológicos, los cuales son importantes en la remediación del agua por acción de la oxidación de la materia orgánica presente. Los sistemas biológicos, en su mayoría, realizan sus actividades metabólicas en un rango de pH 5-9; aunado a eso, el pH de ese rango influye sobre una modificación e ionización de las moléculas, favoreciendo las reacciones metabólicas microbianas y, por ende, los procesos de oxidación y respiración

celular. Entre los tratamientos evaluados no existe diferencia significativa en este parámetro, manteniendo un rango de pH de 8.35- 9.42.

Otro parámetro que permite evaluar la calidad del agua y, a la vez, el comportamiento microbiano en la remediación del agua es el oxígeno disuelto, siendo este necesario para utilizarse en la oxidación microbiana de la materia orgánica. Se observa que la cantidad de oxígeno disuelto presente en el agua antes de ser tratada es significativamente menor (2.84 ppm) con relación a lo determinado en el agua tratada con *Pseudomonas* sp. (7.29 ppm), *C. sorokiniana* con luz y agitación (7.29 ppm), el control negativo (7.54 ppm) y *C. vulgaris* con agitación (7.74 ppm); no encontrándose diferencias entre estos últimos.

La presencia de materia orgánica en el agua residual es considerada el sustrato principal de las poblaciones microbianas presentes en el agua, encontrándose las proteínas (y los compuestos productos de su degradación), carbohidratos y grasas entre los principales compuestos. La cantidad de materia orgánica presente en el agua antes y después de tratar no presentó diferencias significativas, encontrándose en un rango de 0.45 a 1.06 %.

De manera complementaria a la materia orgánica, la demanda química de oxígeno se define como la cantidad de oxígeno disponible para una oxidación química de la materia orgánica presente en el agua residual.

Se observó que el agua tratada con ambas microalgas cultivadas solo bajo condiciones de agitación presentó menor cantidad de oxígeno disponible (*C. sorokiniana* = 85 mg/L; *C. vulgaris* = 91.33 mg/L); de manera significativa y en mayor proporción, el agua tratada con *C. sorokiniana* con luz y agitación arrojó una DQO de 216.66 mg/L; valor significativamente menor al estimado en el agua antes de tratar ($T_0 = 335$ mg/L), *C. vulgaris* con luz y agitación (381.66 mg/L) y el control negativo (406.66 mg/L); no presentando estos últimos tres tratamientos diferencias significativas entre sí. Reforzando la relación entre materia orgánica y la presencia de oxígeno, se entiende que la demanda bioquímica de oxígeno radica en medir la cantidad de oxígeno presente y necesario para la oxidación biológica de la materia orgánica.

El agua tratada con *C. vulgaris* cultivada bajo condiciones de agitación, presentó una DBO de 21.13 mg/L, valor significativamente menor a la determinada en el agua tratada con *C. vulgaris* cultivada bajo ambas condiciones (44.97 mg/L) y en el agua antes de tratar (48.8 mg/L), no presentando diferencias entre estas últimas.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros bioquímicos del agua como producto de la actividad de biorremediación

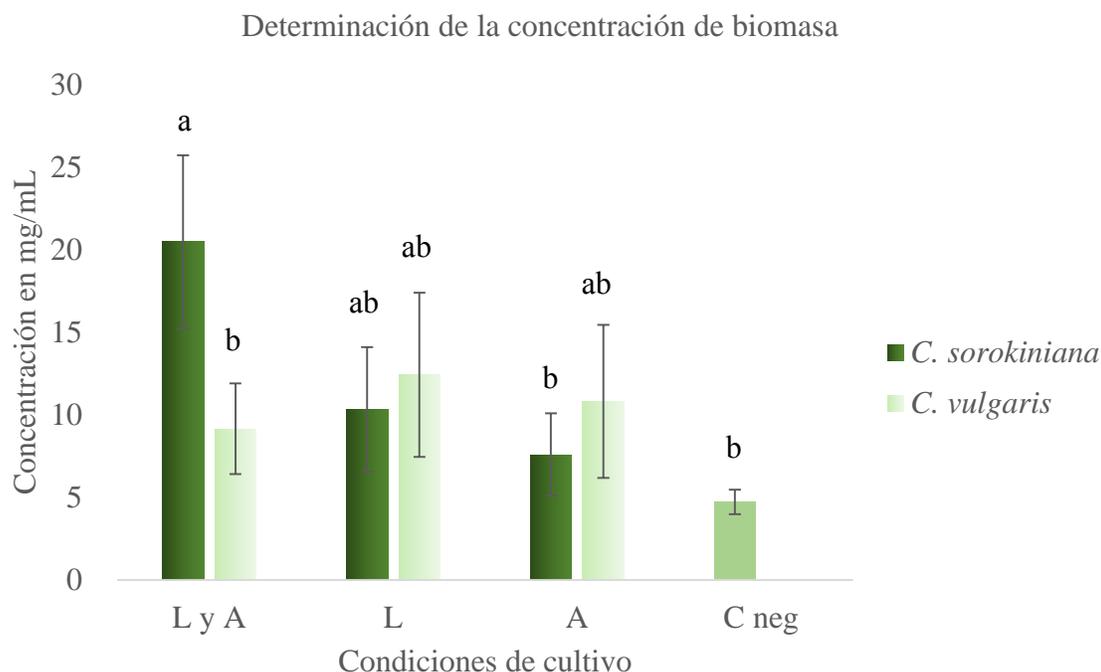
	T0	CN	B. s.	P. sp	<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Chlorella sorokiniana</i>		
					L y A	L	A	L y A	L	A
	2.22±			1.86±						
CE (mS)	0.311	1.587±	2.13±	0.13ab	1.48±	1.41±	1.72±	1.5±	1.41±	1.76±
	a	0.22bc	0.12ab	c	0.21bc	0.19d	0.26b	0.1bcd	0.18cd	0.19abc
pH	8.35±	9.113±	8.37±	8.5±	9.38±	9.42±	9.04±	9.4±		
	.15	0.74	0.33	0.22	0.35	0.4	0.44	0.8	9.35± 0.54	8.81± 0.37
Turbidez (FTU)				6.91±			20.98			
	115±	9.843±	11.82±	2.28bc	17.64±	2.6167± ±	7.7±	3.07±		4.6367±
	15 a	1.52bcd	1.74bcd	d	2.1bc	0.39d	4.25b	1.4bcd	0.15cd	0.54cd
OD (ppm)	2.84±									
	0.067	7.54±	6.4±	7.29±	6.65±	6.72±	7.75±	7.3±	6.89±	6.3567±
	b	1.66a	.15ab	1.52 a	1.65ab	1.47ab	1.87 a	2.3 ^a	1.92ab	0.41ab
MO total (%)	1.03±	1.036±	0.91±	0.99±	0.48±	1.0106±	1.06±	0.5±		
	.32	0.35	0.38	0.19	0.01	0.29	0.13	0.2	1.02± 0.18	0.4± 0.05
N total (%)	0.2±	0.228±	0.18±	0.02±	0.14±	0.2121±	0.18±			
	0.077	0.07	0.08	0	0.08	0.06	0.07	0.1± 0	0.2± 0.03	0.1± 0.03
DQO (mg/L)				130.67			91.33			
	335± ±	406.667	133±	±	381.67	±				
	8.66 a	96.09a	41.8bc	c	44.81 ^a	6.81bc	c	30.6b	40.41c	85± 21.79c
DBO₅ (mg/L)	48.8±	37.7±	33±	34.73±	44.97±	36.53±	±	33.2±	28.03±	28.33±
	16.6 a	0.96 ab	8.06ab	3.26ab	8.03ab	5.94ab	5.27b	6.2ab	10.55ab	2.46ab

* A= agitación; B.s. = *Bacillus subtilis*; CN = control negativo; CE = conductividad eléctrica; L = luz; L y A= luz y agitación; MO = materia orgánica; N = nitrógeno total; OD = Oxígeno disuelto; DQO= demanda química de oxígeno; DBO₅= demanda bioquímica de oxígeno; P. sp = *Penicillium* sp; T0 = tiempo cero.

7.4 Cuantificación de grasas totales y proteínas

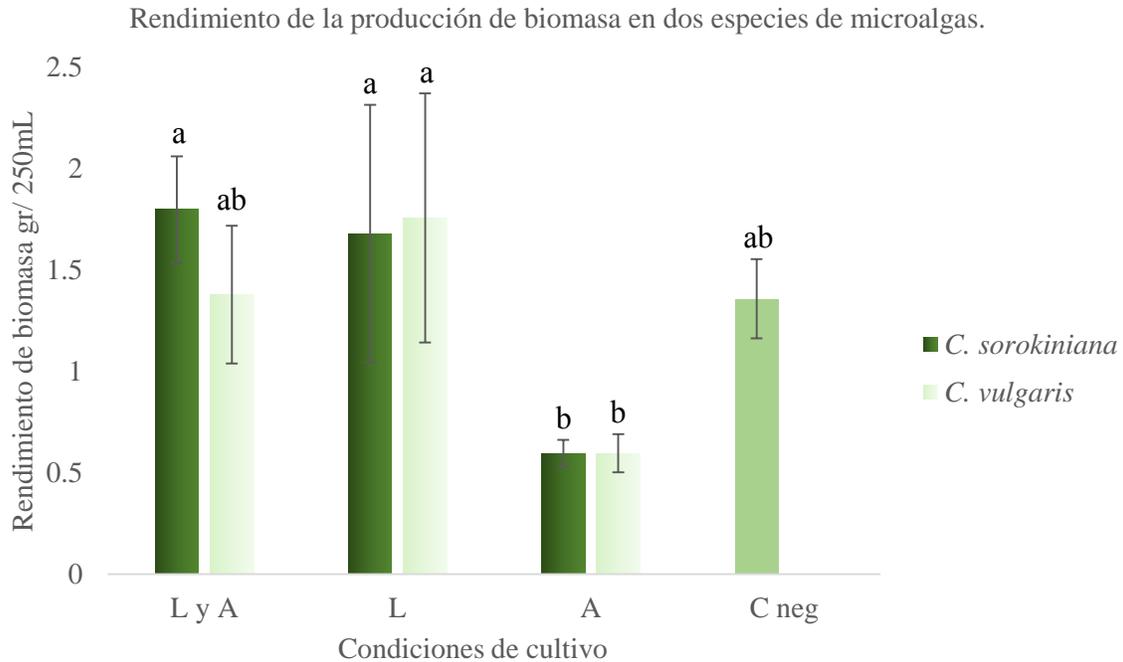
Teniendo en cuenta la importancia de lo reportado en las especies de microalgas, se procedió a analizar el contenido de grasas totales y proteínas en ambas cepas cultivadas bajo las distintas condiciones. Previo a esa determinación, se estableció la concentración de biomasa por mililitro y el rendimiento de biomasa con relación al volumen total de cultivo, con el objetivo de evaluar el potencial en la producción y crecimiento de biomasa de las microalgas cultivadas bajo diversas condiciones. La concentración de biomasa por mililitro fue menor en el control negativo (4.73 mg/mL), siendo esta significativamente diferente a la

obtenida en *C. sorokiniana* cultivada bajo ambas condiciones (20.5 mg/mL). *C. vulgaris* con luz y agitación (9.167 mg/mL), y *C. sorokiniana* solo con agitación (7.6 mg/mL) fueron significativamente menores a la concentración más alta, pero sin presentar diferencias con el control negativo (Gráfica 1).



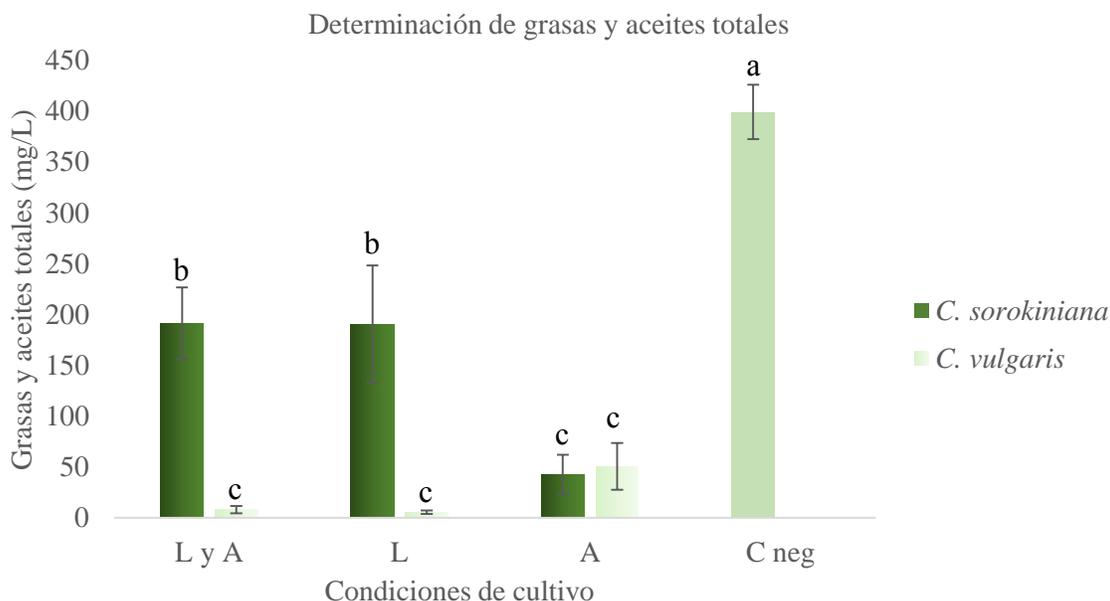
Gráfica 1. Relación de biomasa de microalgas producida por mililitro. Las letras indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación.

El rendimiento de biomasa mayor se presentó en los tratamientos *C. sorokiniana* con luz y agitación (1.8 mg/250 mL), *C. vulgaris* solo con luz (1.76 mg/250 mL) y *C. sorokiniana* con luz (1.68 mg/250 mL), no encontrándose diferencias significativas entre estos; esto en comparación con lo determinado en ambas cepas cultivadas solo bajo condiciones de agitación, donde se presentó el menor rendimiento (0.6 mg/250 mL), siendo esta diferencia significativa ($p = 0.05$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Rendimiento de biomasa con relación al volumen total de agua tratada. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación.

La producción de grasas totales se observó en todos los tratamientos, siendo el control negativo el tratamiento con mayor cantidad de grasas totales (399.33 mg/mL). *C. sorokiniana* cultivada bajo ambas condiciones (191.5 mg/mL) y solo bajo condiciones de luz (190.5 mg/mL) presentan una menor producción que el control negativo, pero es a su vez mayor, significativamente, que lo determinado en *C. sorokiniana* con agitación (42.67 mg/mL) y lo producido por *C. vulgaris* bajo las tres condiciones de cultivo establecidas (Gráfica 3).

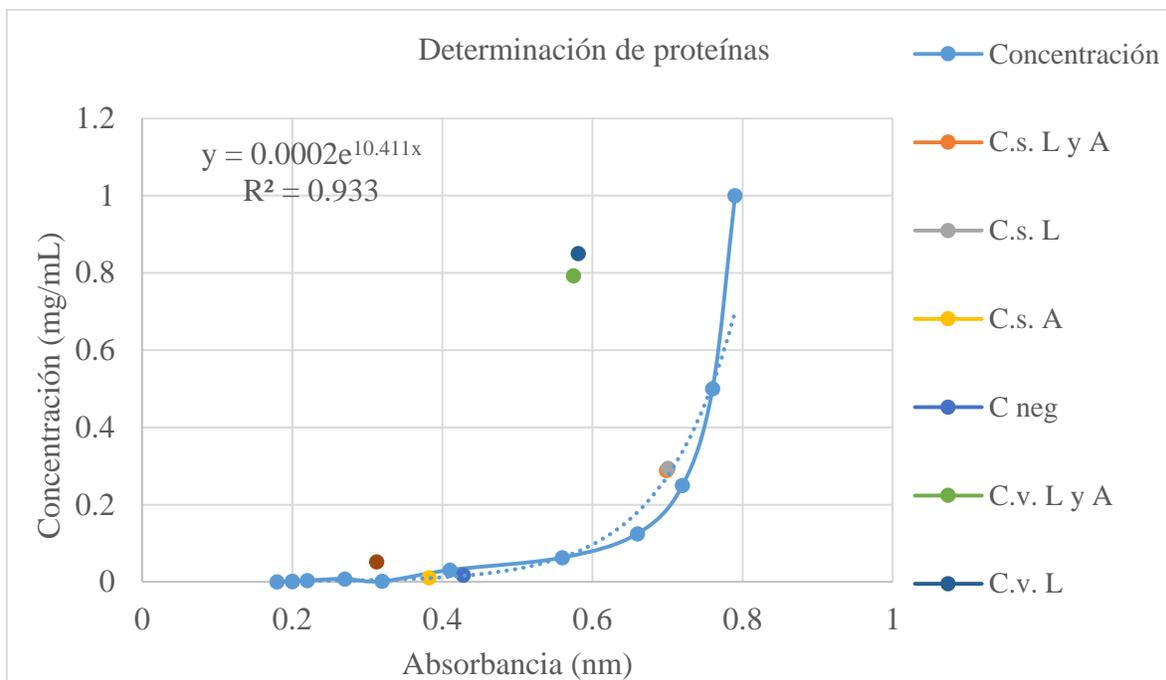


Gráfica 3. Determinación de la concentración de grasas y aceites por litro de muestra. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). L = luz; A = agitación.

7.5 Cuantificación de proteínas

Bajo el mismo criterio que el análisis de grasas totales, se sugiere la producción de proteínas de interés. Por lo anterior se determinó la concentración de proteínas por el micrométodo de Bradford, y se comparó la producción mediante un ANOVA de un factor ($p = 0.05$). El cálculo de la concentración de proteínas se obtuvo con la ecuación procedente de la curva estándar, donde $y = 0.0002e^{10.411x}$; donde “y” es igual a la concentración proteica y “x” es la variable independiente procedente de la absorbancia obtenida en las lecturas de cada tratamiento ($R = 0.933$).

Al comparar la producción entre los tratamientos se observó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo, existe una mayor producción en las cepas de *C. vulgaris* cultivadas bajo ambas condiciones (0.79 mg/mL) y luz (0.85 mg/mL), en contraste con la producción observada en *C. sorokiniana* bajo las mismas condiciones (ambas = 0.29 mg/mL; y luz = 0.29 mg/mL). En el caso de ambas cepas cultivadas solo bajo condiciones de agitación, también se produjo un poco más de proteína en *C. vulgaris* (0.052 mg/mL) que en *C. sorokiniana* (0.011 mg/mL); esta última inferior incluso a lo determinado en el control negativo (0.017 mg/mL) (Gráfica 4).



Gráfica 4. Determinación de la concentración de proteínas. La concentración se determinó por medio de la ecuación logarítmica de la línea de tendencia de la curva estándar.

A = Agitación; C neg = control negativo; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; L = Luz; L y A = Luz y agitación.

De manera complementaria, las concentraciones de proteína obtenidas en la *C. sorokiniana* y *C. vulgaris*, se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Concentración de proteínas de *Chlorella sorokiniana* calculada con la ecuación $y = 0.0002e^{10.411x}$

<i>Chlorella sorokiniana</i>	
	Concentración (mg/mL)
Luz y agitación	0.28841
Luz	0.29448
Agitación	0.01071
Control negativo	0.01723

Tabla 4. Concentración de proteínas de *Chlorella vulgaris* calculada con la ecuación $y = 0.0002e^{10.411x}$

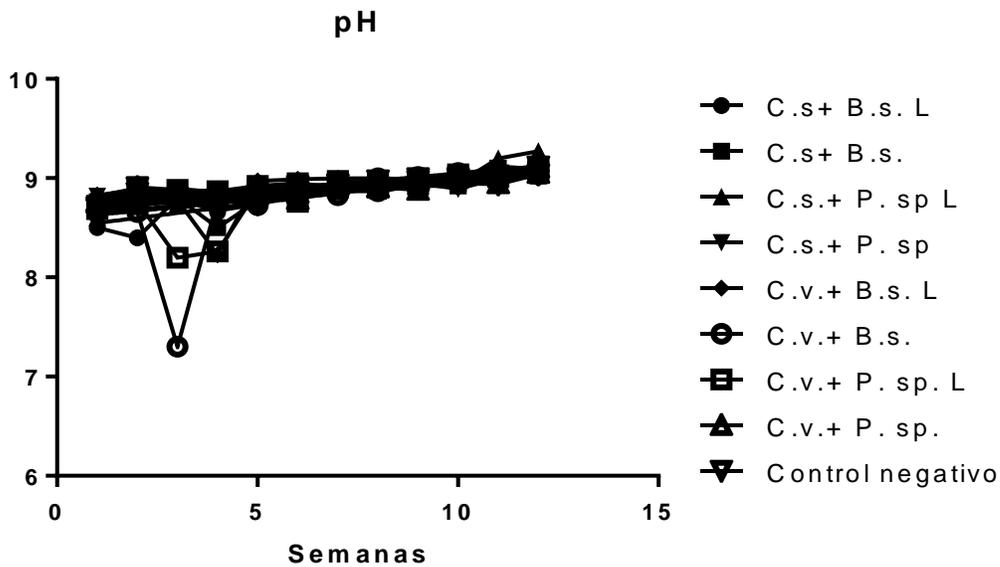
<i>Chlorella vulgaris</i>	
	Concentración (mg/mL)
Luz y agitación	0.793142
Luz	0.85015
Agitación	0.05185
Control negativo	0.01723

7.6 Actividad remediadora de los consorcios microbianos

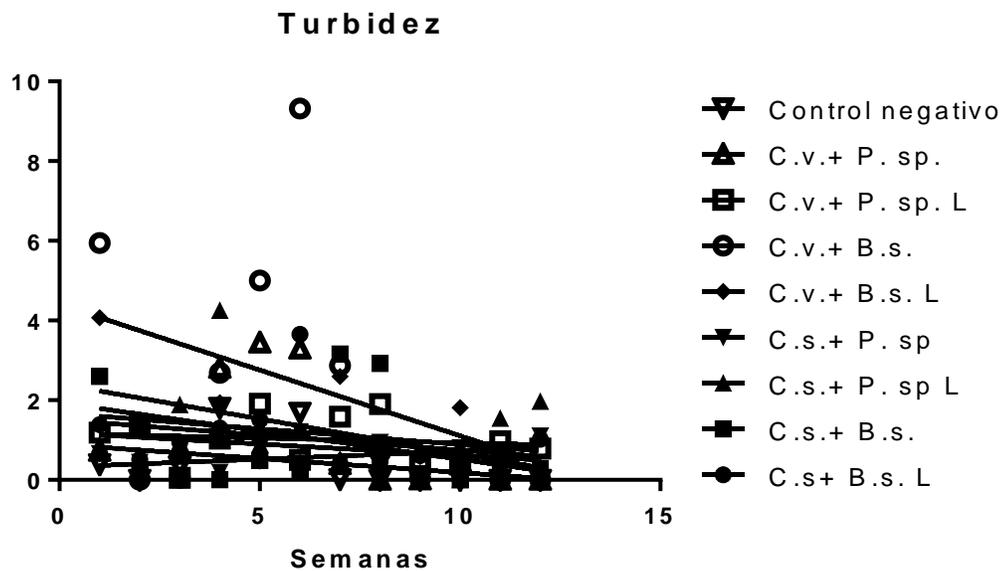
La actividad remediadora de los consorcios microbianos se evaluó sobre el proceso de tratamiento de aguas escalado donde, en un sistema abierto, se analizaron los parámetros fisicoquímicos que permiten elucidar la actividad remediadora de los consorcios probados. Dicho procedimiento se realizó por 12 semanas y por duplicado, y para su comparación se recurrió a la comparación de pendientes y elevaciones por medio de la escala de Fisher ($p = 0.05$).

En el caso del pH, la totalidad de los tratamientos no presentó diferencia en ninguno de los dos parámetros mencionados (pendiente = 0.3705; elevación = 0.227) (Gráfica 5). La totalidad de los tratamientos mantuvo un pH en un rango de 8-9.5, que, si bien es idóneo para la realización de los procedimientos bioquímicos indispensables para la vida, presenta una ligera tendencia a ir incrementando, esto al comparar el tiempo inicial del proceso con el tiempo final.

Al analizar las cinéticas de los tratamientos en el parámetro de turbidez, se presentó un fenómeno similar, al no observarse diferencias estadísticas entre los tratamientos (pendiente= 0.4899; elevación= 0.05744). Sin embargo, los datos recolectados muestran una mayor variabilidad, donde el desarrollo de la biomasa de los microorganismos utilizados se considera que influyen en el incremento de la absorción de luz y, por ende, incremento en la turbidez (Gráfica 6).

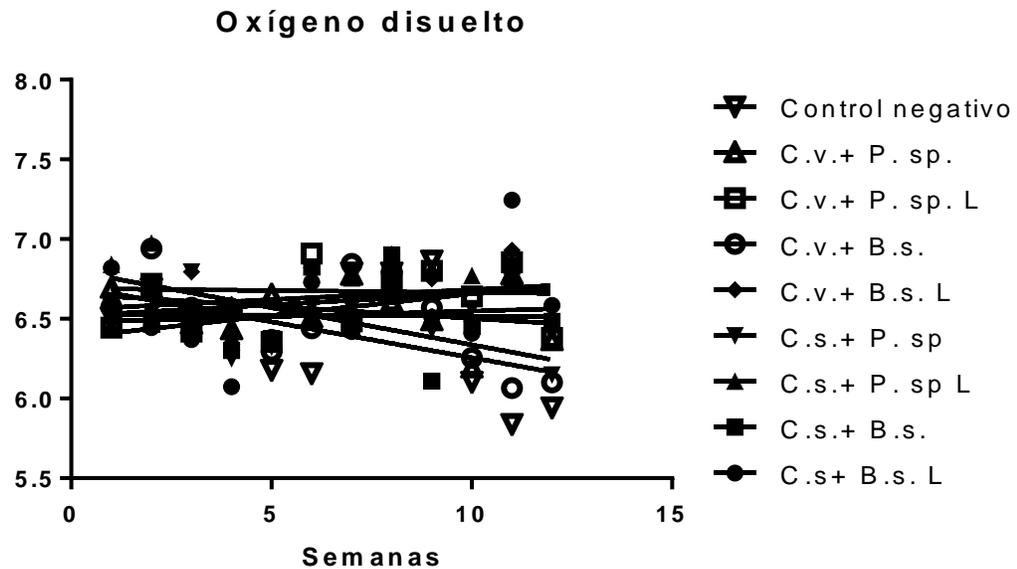


Gráfica 5. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de pH entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.



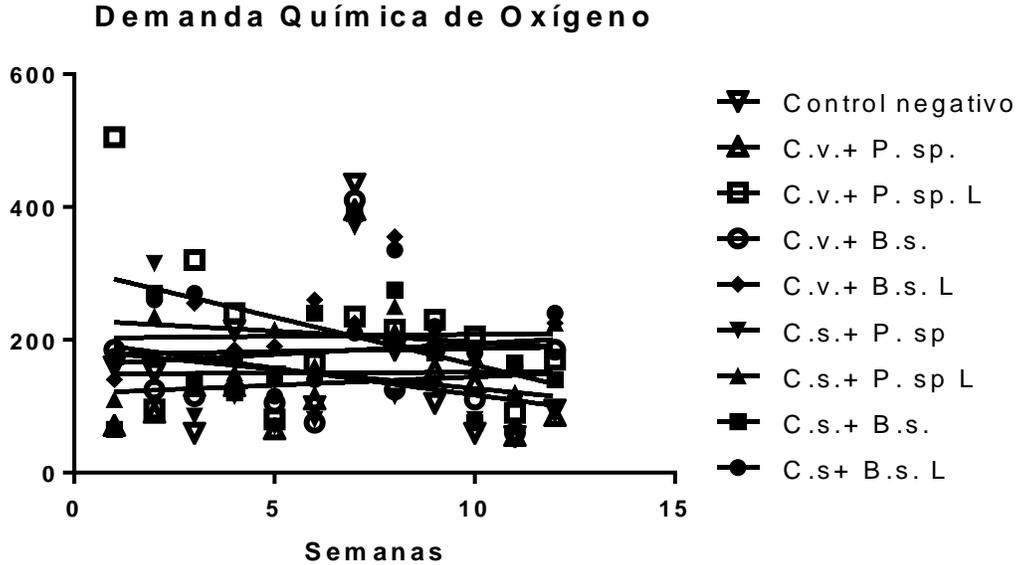
Gráfica 6. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de turbidez entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

Otro de los parámetros analizados fue el oxígeno disuelto, en donde las determinaciones establecidas no mostraron diferencias estadísticas entre la totalidad de los tratamientos (pendiente = 0.06382; elevación = 0.1903), presentándose un rango de concentración de oxígeno disuelto entre 6 y 8 ppm, indicando saturación de oxígeno suficiente para promover la remoción de nutrientes y contaminantes (Gráfica 7).



Gráfica 7. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de OD entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium sp.*

La DQO obtenida se comparó entre los tratamientos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos, esto al comparar las elevaciones ($p = 0.15$) y pendientes ($p = 0.73$). Cabe destacar que, durante las 12 semanas la DQO, muchas de las determinaciones individuales se mantuvieron muy por debajo de los niveles permisibles, aunque se observaron de manera contraria, algunas determinaciones con niveles por encima de los niveles permisibles (150 mg/L), según la NOM-001-SEMARNAT-1996 (Gráfica 8).



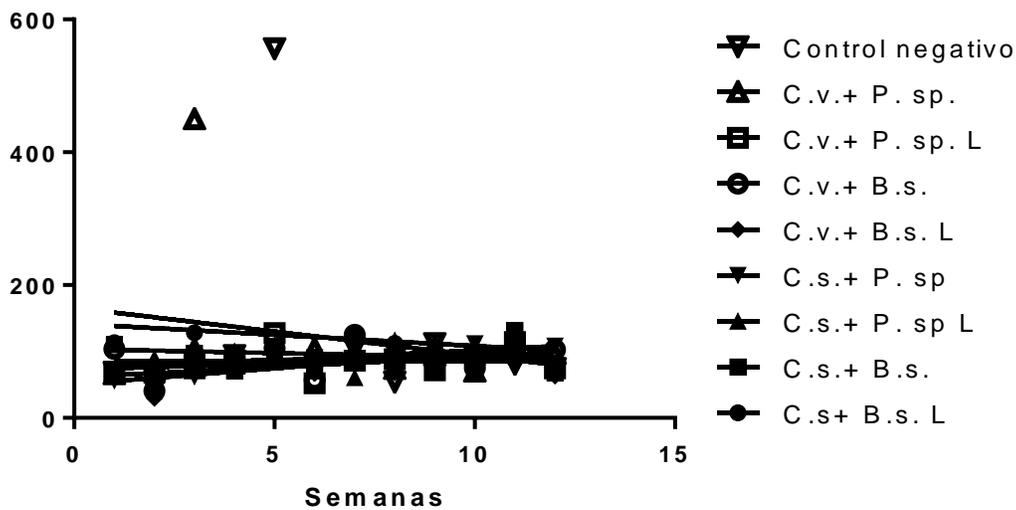
Gráfica 8. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la DQO entre tratamientos. A= Agitación; L= Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium sp.*

En el caso de la DBO se observó un fenómeno similar entre los tratamientos. No se presentaron diferencias significativas entre pendientes (0.8164) y elevaciones (0.604) de cada tratamiento. Cabe resaltar que la totalidad de los tratamientos mostró, en cada determinación semanal, mediciones por debajo de los límites establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996, donde estipula límites permisibles de 150 mg/L (Gráfica 9).

Teniendo en cuenta la materia orgánica (Gráfica 10) como parámetro se observa que al comparar las pendientes (0.851) y elevaciones (0.6845) de los datos determinados, no se presentan diferencias entre los tratamientos, presentan un rango de 0.01-1.25% del total de la muestra, disponible para la oxidación de esta en el proceso de remediación.

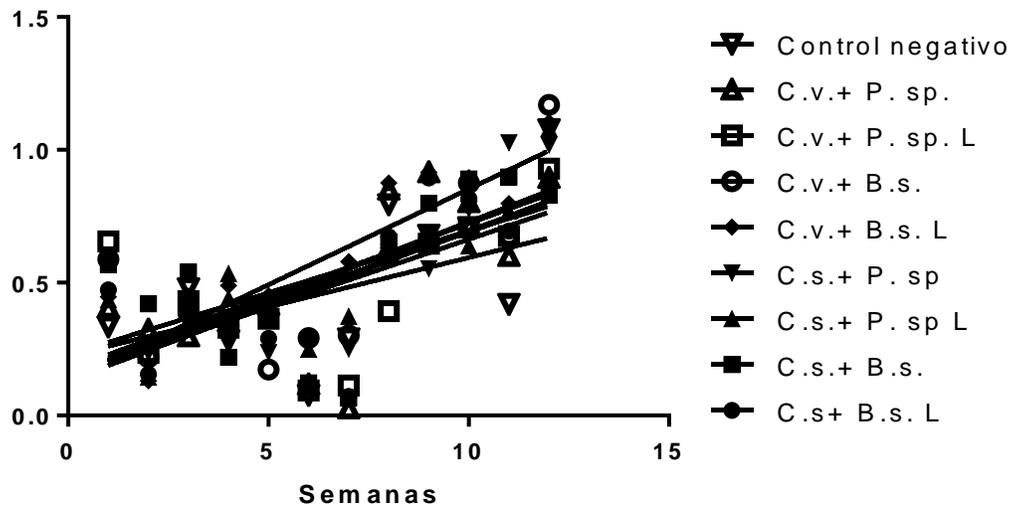
De manera similar y teniendo en cuenta el nitrógeno como parámetro dentro de la materia orgánica disponible para su asimilación, se observa que al comparar las pendientes (0.848) y elevaciones (0.68) de los datos determinados, no se presentan diferencias entre los tratamientos, presentan un rango de 0.01-0.25% del total de la muestra, disponible para la oxidación de esta en el proceso de remediación (Gráfica 11).

Demanda Bioquímica de Oxígeno

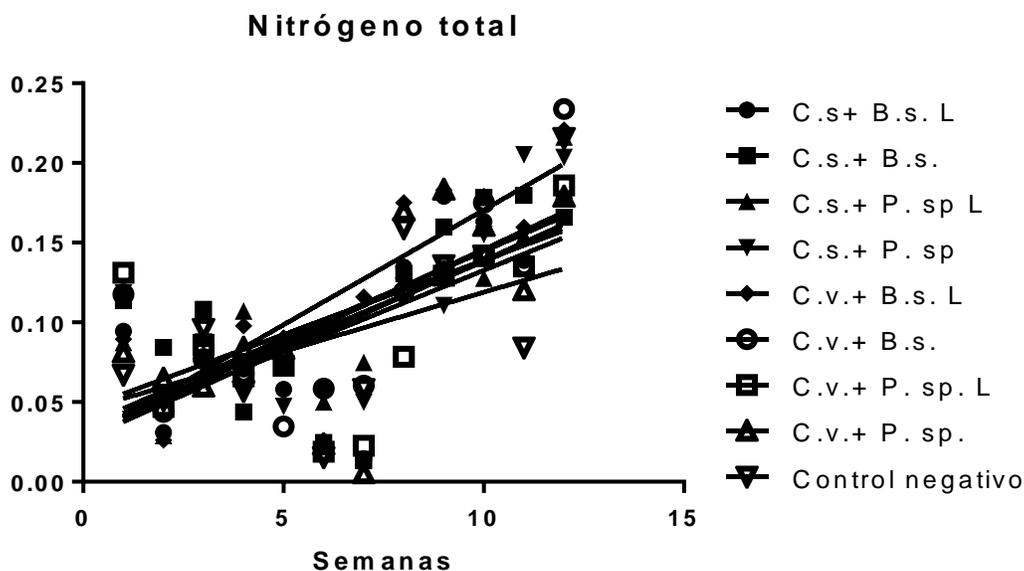


Gráfica 9. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la DBO₅ entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

Materia orgánica



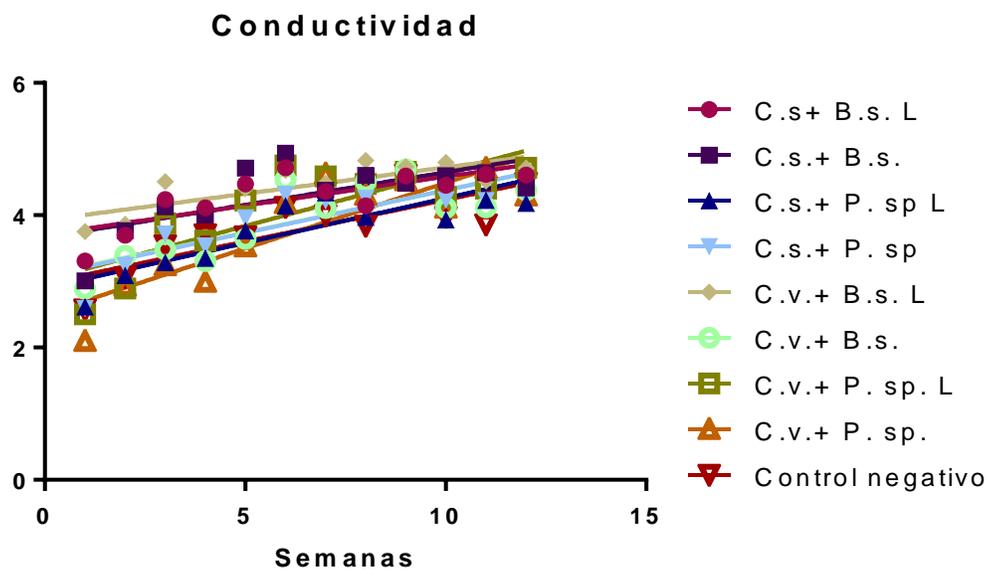
Gráfica 10. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de la materia orgánica entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.



Gráfica 11. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de nitrógeno entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

Por el contrario, la comparación entre los tratamientos en el caso de la conductividad demuestra que, al menos uno de ellos es diferente al resto, esto al comparar las elevaciones ($P < 0.001$) y pendientes (0.07) de las rectas obtenidas de la regresión lineal (Gráfica 12). En la Tabla 5, se muestran las diferencias y similitudes entre los tratamientos dentro del parámetro de conductividad.

Al comparar *C. sorokiniana* + *B. subtilis* con luz con el resto de los tratamientos, se observó una diferencia significativa con la conductividad determinada en el agua tratada con *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. con luz (elev = 0.000145), *C. vulgaris* + *B. subtilis* (elev = 0.002888), control negativo (elev = 0.000145) y con *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. (pend = 0.007155; elevación no determinada por la amplia diferencia entre pendientes).



Gráfica 12. Análisis de pendientes y elevaciones para el establecimiento de diferencias significativas de conductividad entre tratamientos. A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

En contraste con el resto de los tratamientos, no existe diferencia entre el tratamiento referenciado inicialmente y el resto que no fueron mencionados. Teniendo como referencia el agua tratada con *C. sorokiniana* + *B. subtilis*, se establecen diferencias significativas al comprarlo con el agua tratada con la combinación de *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp., bajo ambas condiciones de proceso, por separado (luz = 0.00031; y sin ella= 0.01), *C. vulgaris* + *B. subtilis* (elev = 0.0046), *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. (pend = 0.025; elevación no determinada por la amplia diferencia entre pendientes) y el control negativo (elev = 0.0003; pendiente no determinada por la amplia diferencia entre elevaciones).

Tabla 5. Combinación de tratamientos y definición de las diferencias estadísticas entre ellos (conductividad).

Parámetro	C.s.+ B.s. L	C.s.+ B.s.	C.s.+ P. sp. L	C.s.+ P. sp.	C.v.+ B.s. L	C.v.+ B.s.	C.v.+ P. sp. L	C.v.+ P. sp.	C neg
C.s.+ B.s. L		ND	D	ND	ND	D	ND	D	D
C.s.+ B.s.	ND		D	D	ND	D	ND	D	D
C.s.+ P. sp. L	D	D		ND	D	ND	D	ND	ND
C.s.+ P. sp.	ND	D	ND		D	ND	ND	ND	ND
C.v.+ B.s. L	ND	ND	D	D		D	D	D	D
C.v.+ B.s.	D	D	ND	ND	D		ND	ND	ND
C.v.+ P. sp. L	ND	ND	D	ND	D	ND		ND	D
C.v.+ P. sp.	D	D	ND	ND	D	ND	ND		ND
C neg	D	D	ND	ND	D	ND	D	ND	

A = Agitación; L = Luz; C neg = control negativo; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp. D = diferencia; ND = no diferencia.

Usando como referencia el agua tratada con *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. con luz, se establecen diferencias significativas al contrastar con *C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz (elev = $P < 0.001$) y *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. con luz (elev = 0.04261).

Al comparar el agua tratada con la combinación de *C. sorokiniana* + *Penicillium* sp., se establece una diferencia significativa con relación al agua tratada con *C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz (elev = 0.0003); no presentándose diferencias al contrastar con el resto de los tratamientos.

El agua tratada con la combinación de *C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz es estadísticamente significativa al compararla contra el agua tratada con *C. vulgaris* + *B. subtilis* (elev = $P < 0.001$), *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. con luz aplicada (pend = 0.04384, elevación no determinada por la amplia diferencia entre pendientes); y sin ella (pend = 0.005,

elevación no determinada por la amplia diferencia entre pendientes); y con el control negativo ($P < 0.001$).

El tratamiento *C. vulgaris* + *Penicillium* sp. con luz presenta diferencias estadísticas al contrastar con el control negativo (elev = 0.0477).

7.7 Biomasa microbiana como suplemento alimenticio en cabras Saanen (*Capra aegagrus hircus*)

Para analizar el efecto de la biomasa obtenida del tratamiento de aguas escalado, se realizó un bioensayo donde se evaluaron muestras de sangre para determinar algunos de los parámetros químicos de la sangre, cada uno determinándose en tres tiempos del proceso. Desde un enfoque cualitativo, la glucosa, ácido úrico, urea y creatinina los valores obtenidos se mantuvieron dentro del rango de valores normales, esto durante los tres tiempos de medición (Tabla 6); a diferencia de lo observado en los niveles de triglicéridos y colesterol, en los cuales, la totalidad de los tratamientos, mostraron niveles superiores con relación a los valores normales (Tabla 7).

Tabla 6. Química sanguínea realizada en cabras Saanen (*Capra aegagrus hircus*).

	Glu (mg/dL)			A. U. (mg/dL)			U. (mg/dL)			C. (mg/dL)			T. (mg/dL)			Cl. (mg/dL)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
	Cabra 3	72	56	62	2.6	2.6	2.3	28	27	27	0.9	0.7	0.7	44	22	38	133	123
Cabra 4	61	48	63	2.5	2.9	2.1	29	28	29	0.9	1	0.8	38	48	42	133	151	113
Cabra 5	54	66	66	2.5	2.7	2.1	27	28	28	0.8	0.9	0.8	45	47	41	107	142	103
Cabra 6	68	56	69	2.6	2.4	2	27	29	28	0.8	0.9	0.7	44	35	52	140	139	90
Cabra 7	56	63	72	2.5	3	2.4	28	29	28	0.9	1.1	0.9	40	42	51	119	160	131

Datos expresados en miligramos sobre decilitro (mg/dL)

Tabla 7. Valores de referencia de referencia de los parámetros bioquímicos analizados en cabras Saanen (*Capra aegagrus hircus*) (Posada *et al.*, 2012)

Parámetro de química sanguínea	Valor de referencia
Glucosa (Glu)	50-75 mg/dL
Urea (U)	22-43 mg/dL
Creatinina (C)	0.8-1.5 mg/dL
Triglicéridos (T)	19-25 mg/dL
Colesterol (Cl)	80-130 mg/dL
Ácido úrico (A.U.)	ND

ND = no determinado.

De manera complementaria, se definió la diferencia en el peso de las cabras, antes y después del bioensayo. De manera cualitativa, se observó que la cabra 3 (*C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz) presentó una mayor ganancia de peso (4.5 kg), seguida de las cabras 4 (*C. vulgaris* + *Penicillium* sp. con luz) y 6 (*C. sorokiniana* + *Penicillium* sp. con luz) incrementaron 4.2 kg de peso, sin embargo, la cabra 4 tenía una diferencia de peso de -2 kg, con relación a la cabra 6. La cabra 5 (*C. sorokiniana* + *B. subtilis* con luz) presentó un incremento de 4.1 kg, 0.1 kg más que el incremento presentado en la cabra 7 (control negativo), que fue la que menor incremento de peso tuvo (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación del peso de las cabras Saanen (*Capra aegagrus hircus*) durante el tiempo del bioensayo.

	Peso (kg)			Diferencia de peso (kg)
	T0	T1	T2	
Cabra 3	17.5	20	22	4.5
Cabra 4	15.8	18	20	4.2
Cabra 5	19.4	21.5	23	4.1
Cabra 6	17.8	20	22	4.2
Cabra 7	18	20	22	4

En el presente estudio, se procedió a analizar el porcentaje de proteínas y grasas presentes en la biomasa obtenida como subproducto del tratamiento de aguas para comparar la producción de ambas biomoléculas en los diversos tratamientos. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que no existen diferencias significativas en la distribución de los tratamientos evaluados para el caso de las grasas ($p = 0.101$) (Tabla 9), fenómeno presentado de manera similar en las proteínas ($p = 0.079$) (Tabla 10).

Tabla 9. Porcentajes de grasas totales obtenidos por el método soxhlet, a partir de la biomasa generada del proceso continuo de tratamiento de aguas por 12 semanas.

Control negativo		C.s.+ B.s. L		C.s.+ P. sp L		C.v.+ B.s. L		C.v.+ P. sp L	
Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
2.2	2.0	3.9	3.7	2.8	2.5	3.1	3.4	2.0	2.8

L = Luz; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

Tabla 10. Porcentajes de proteína total obtenidos por el método Kjeldahl, a partir de la biomasa generada del proceso continuo de tratamiento de aguas por 12 semanas.

Control negativo		C.s.+ B.s. L		C.s.+ P. sp L		C.v.+ B.s. L		C.v.+ P. sp L	
Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
1.25	1.07	0.79	0.74	0.63	0.56	0.31	0.37	0.63	0.62

L = Luz; B.s. = *Bacillus subtilis*; C.s. = *Chlorella sorokiniana*; C.v. = *Chlorella vulgaris*; P. sp. = *Penicillium* sp.

8. Discusión

Actualmente se conoce que la comunidad microbiana del agua residual y los componentes utilizados en el tratamiento de esta, interactúan de una manera compleja donde el flujo de materia y energía impacta de manera directa en dicha comunidad. Dentro de un ecosistema, las poblaciones y comunidades se someten a factores donde se pone a prueba su resistencia, su adaptación y su variabilidad; factores que definen la estabilidad de cada ecosistema; fenómeno que puede controlarse en una mayor medida dentro de los procesos definidos bajo sistemas de ingeniería; que, si bien no poseen el alcance para describir un fenómeno natural completo, si es de gran utilidad para describir un proceso bajo condiciones controladas. Reforzando el tratamiento de aguas, un fenómeno descrito con anterioridad es la observación de las comunidades cuando, bajo ciertas condiciones, la adición de poblaciones induce un flujo en la interacción de estas, provocando una estabilidad en el ecosistema bajo condiciones controladas. Lo anterior considerando que la ausencia de poblaciones fuertes provoca una fluctuación estocástica, y que, a la vez, sustenta una correlación positiva entre la biodiversidad y la estabilidad de los ecosistemas (Pimm, 1984; Huisman y Weissing, 2002; Briones y Raskin, 2003).

Una evidencia de la capacidad funcional y metabólica de una comunidad microbiana, dentro de ecosistemas distintos como las condiciones del tratamiento de aguas, se relaciona con la riqueza taxonómica de la comunidad en cuestión, incrementando las interacciones positivas entre los organismos presentes, y por ende la funcionalidad del mismo; demostrándose una asociación negativa, a su vez, con las concentraciones de N y BOD₅, sugiriéndose una asimilación de nitrógeno y carbono procedentes del agua tratada (Johnson *et al.*, 2015). Yang *et al.* (2011b) reportaron, mediante la identificación bacteriana por pirosecuenciación de ADN procedente de muestras de lodos activados, la presencia de grupos bacterianos pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (más abundante), *Bacteroidetes* y *Firmicutes*; fenómeno que se presentó de manera similar en el presente estudio; sin embargo, la diferencia en especies está presente.

Además, Yang *et al.* (2011b) reportaron bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas*, *Thaurea* y *Dechloromonas*; en contraste con lo reportado en el presente documento, con la presencia de *Nostoc*, *Desulfovibrio*, *Arthrobacter*, *Clostridium*,

Leptothrix, entre otros. Por otra parte, la acción metabólica bacteriana indica que la presencia de especies de bacterias oxidantes de amonio son las que prevalecen en distintos reactores para tratamiento de aguas convencional (Ye *et al.*, 2012).

Es importante explicar los esquemas de relaciones interespecíficas que se pueden encontrar en las comunidades microbianas presentes en el tratamiento de aguas, que podría considerarse como un cultivo mixotrófico. Se ha reportado que la utilización de consorcios microbianos mejoran el rendimiento de los procesos de remoción de nutrientes y contaminantes, como lo observado en la utilización conjunta de *C. vulgaris* y *Rhodotorula glutinis*, que han demostrado ser eficaces al utilizar agua procedente de los procesos industriales como medio de cultivo (Hu *et al.*, 2019); *E. coli* y *C. minutissima* incrementando la capacidad de asimilar fuentes de carbono como glucosa, acetato y glicerol, en contraste con las capacidades de los microorganismos mencionados en condiciones axénicas; y *Selenastrum capricornutum* en conjunción con cepas del género *Mycobacterium* sp., capaces de degradar compuestos como el pireno (Higgins y Vander-Gheynst, 2014).

En el caso de las comunidades fúngicas se han reportado estudios donde se expone la variedad de grupos e individuos, esto entre las diversas condiciones bajo las que se realiza el tratamiento de aguas. Zhang *et al.* (2018) reporta que existen diferencias en la composición de las comunidades fúngicas entre las plantas de tratamiento de agua convencionales, zanjas de oxigenación y sistemas anóxicos-anaerobios-aerobios. *Ascomycota* y *Basidiomycota* fueron los filos de mayor prevalencia, de manera similar a lo reportado en el presente estudio. Aunado a esto, el autor reporta que la actividad fúngica afecta de manera significativa a la temperatura, pH, fósforo y nitrógeno presente en el agua a tratar, sugiriendo la acción metabólica de estos organismos sobre la transformación de esos componentes. *Sporobolomyces* y *Rhodotorula* son géneros que el autor reporta, de manera similar a lo reportado en este documento; sin embargo, difieren los géneros *Cylindrocarpon*, *Parascedosporium* y *Stemphylium*, con relación a lo reportado en este artículo.

Si bien las bacterias y los hongos influyen sobre la remoción de sustancias procedentes del agua residual como compuestos aromáticos e hidrocarbonados, los mecanismos varían entre ambos, presentándose en los hongos saprófitos, patógenos de animales y endosimbiontes (Wei *et al.*, 2018); caso reportado en este documento, donde

géneros como *Mucor*, *Trichosporon*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida*, se identifican con estos mecanismos celulares.

Dentro de los procesos de tratamiento de agua residual se establece una comunidad de microorganismos, la cual establece diversas relaciones interespecíficas entre ellas la depredación; donde es bien sabido que la población bacteriana se ve afectada principalmente por protistas y bacteriófagos, perjudicando, de primera instancia, la actividad remediadora de las bacterias al disminuir su población; sin embargo Friman y Buckling *et al.* (2007) reportaron la capacidad de depredadora de los protistas, los cuales tenían como presa aquellas bacterias infectadas por bacteriófagos, de manera que la población bacteriana no se veía perjudicada, dando como resultado una remoción eficiente de contaminantes en el agua, además de mantener los diferentes niveles tróficos brindándole funcionalidad al ecosistema.

Otro fenómeno observable dentro de las interacciones microbianas en los procesos de biorremediación y biodegradación es el observado por la acción de los predadores, donde los protistas tienen la capacidad de influir en las actividades metabólicas de dos maneras: a) constitutiva; y b) no constitutiva. En la primera, los protozoarios utilizan aquellos nutrientes inmovilizados, de manera que se vuelven más accesibles para la presa. En el caso del efecto no constitutivo, los predadores modifican las condiciones del hábitat permitiendo que las presas tengan mayor acceso a nutrientes; como lo ha mostrado *Heteromita globosa*, que potencia la capacidad de absorber nutrientes de *Pseudomonas* sp., al momento de utilizar tolueno y benceno (Mattison y Harayama, 2001; Schmitz *et al.*, 2010).

Como producto del establecimiento de módulos funcionales y el cálculo del índice de finalización de módulos (IFM) y el análisis de parámetros fisicoquímicos se pretende analizar la actividad metabólica microbiana para entender la dinámica del flujo de materia y energía presente dentro del ecosistema presente en la planta de tratamiento de aguas, de manera que, al observarse la disminución de algunos contaminantes, se puede entender que los microorganismos recurren a sus herramientas bioquímicas y moleculares para cumplir con dicho objetivo. Gonçalves *et al.*, (2017) propone que, en el caso de las microalgas, recurren al ciclo de Calvin y a la integración del proceso respiratorio para la fijación de carbono, orgánico e inorgánico; la movilización de nitrógeno, recorriendo vías de la biosíntesis y degradación de aminoácidos y las reacciones rédox para la interconversión de nitrato-amonio; y el transporte de fosfato relacionado activamente con las reacciones de fosforilación.

Con base en nuestros resultados se propone que los microorganismos además recurren a la síntesis de purinas y pirimidinas, y los procesos moleculares de replicación, transcripción y traducción para movilizar nitrógeno y fósforo del medio ambiente al interior celular.

Por otra parte, existe evidencia que la relación entre microorganismos dentro de una comunidad puede ser de carácter positivo o negativo, esto en relación a diversos factores. Se ha observado que la presencia de exudados procedentes de algas y microalgas, caracterizados por ser acil polisacáridos de alto peso molecular, realizando una función de soporte para el crecimiento de la población bacteriana; siendo estos ricos en monosacáridos como ramnosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa y ribosa; evidencia que se respalda con lo observado en el presente estudio, donde se observa actividad en los sistemas de transporte de diversos monosacáridos (Johnson *et al.*, 2020).

Otros fenómenos demuestran la capacidad de asimilar el azufre procedente de fuentes exógenas, esto por una acción conjunta entre fitoplancton y alfa-proteobacterias. Lo anterior puede desencadenar relaciones simbióticas donde, organismos que comúnmente no poseen ciertas funciones celulares, pueden verse beneficiados a establecer dicha relación, como el caso de *Atelocyanobacterium thalassa* con diversos haptofitos, donde el primero carece de la actividad del fotosistema II y el segundo presenta funciones celulares que le permiten fijar nitrógeno; al establecer la simbiosis, complementan dichas funciones con su contra parte (Thompson *et al.*, 2012), lo anterior haciendo alusión a la posibilidad de establecer relaciones de esa naturaleza, permitiendo la asimilación de contaminantes presentes en el agua, para ser incorporado a las diversas vías metabólicas.

Otra actividad metabólica observada en el presente estudio es el transporte de iones de hierro a partir del uso de sideróforos. Se observa que las bacterias mantienen activos diversos mecanismos de transporte relacionados al hierro y otros iones metálicos, algo común en las bacterias; sin embargo, la presencia de este fenómeno sugiere que es posible que organismos eucariotas como las algas, pueden asimilar Fe (III) soluble debido al metabolismo bacteriano, proceso que no hubiera sido posible para el alga si las bacterias no hubieran recurrido a los sideróforos; a cambio, el alga proporciona fuentes de carbono orgánico a la bacteria (Amin *et al.*, 2009). Relacionado a lo descrito con anterioridad, Croft *et al.* (2005) expone que la relación simbiótica entre algas y bacterias provee de vitamina B12 al alga, que carece de la capacidad de sintetizarla por sí misma; y a cambio, esta le brinda nutrientes producto de la

fotosíntesis; en contraste con lo observado en el índice de finalización de módulos del presente documento, *C. reinhardtii*, reportada por el autor como organismos capaz de codificar para genes del complejo metionin sintetasa dependiente y no dependiente de vitamina B12, no se sugiere actividad metabólica relacionada al transporte de esta vitamina.

Relacionado con el transporte de metales, se ha reportado que la simbiosis entre algas y bacterias presenta un efecto sinérgico, donde, en la superficie de ambos, se presentan sitios funcionales (ricos en grupos fosfato y carboxilo) que pueden ser desprotonados teniendo como consecuencia una mayor disponibilidad para los iones metálicos (Lei *et al.*, 2018); como lo observado en el presente documento, donde se reporta en las bacterias la actividad de sistema de transporte de iones metálicos como zinc, hierro, manganeso, cobalto y níquel; fenómeno descrito de manera similar por Cuellar-Bermudez *et al.* (2017).

En el caso de los hongos filamentosos, existen reportes que sitúan en las alternativas para ser involucrados en diversas aplicaciones industriales por su significancia ecológica, entre ellas en el tratamiento de aguas residuales; lo anterior debido a que los hongos presentan herramientas metabólicas que le permiten realizarlo, encontrando entre ellas el proceso de crecimiento filamentosos y macroscópico, la diversidad enzimática, que promueve una baja especificidad de sustratos y al mismo tiempo una alta biodisponibilidad de los mismos; el proceso de sorción celular, producción de moléculas de valor agregado y la capacidad de incluirse en cultivos combinados con otros microorganismos (Ferreira *et al.*, 2020). Dado lo descrito con anterioridad, el uso de hongos filamentosos posee un potencial para la mitigación de la contaminación en diferentes ambientes.

Según lo reportado en el presente trabajo, se observó que los tres filos del reino fungi con mayor presencia en el análisis de poblaciones microbianas pertenecen a los ascomycetes, basidiomycetes y zygomycetes, los cuales se han reportado con anterioridad como grupos de hongos filamentosos que tienen participación en la mitigación de la contaminación en diversos ambientes (Troiano *et al.*, 2020). Estos grupos de hongos recurren a sus herramientas fisiológicas de diferente forma para aprovechar la diversidad de componentes que pueden incorporar a su metabolismo celular.

El hecho de crecer de manera filamentosos, le confiere diversas ventajas:

- 1) incremento en la superficie celular del hongo, logrando un mayor alcance y contacto con los sustratos del medio;

2) incremento hifal, permitiéndole al hongo penetrar en matrices de difícil acceso para otros organismos, como sustratos lignocelulósicos, sedimentos o materiales particulados; y

3) la actividad enzimática extracelular, donde la actividad lítica se hace presente por la acción de amilasas, proteasas, pectinasas, queratinasas, oxidoreductasas, lipasas, xilanasas, entre otras, tienen acción sobre sustratos como grasas, queratina, polisacáridos vegetales y proteínas (Wan y Li, 2012; Sharma y Devi, 2018; Ferreira *et al.*, 2020).

Lo anterior se acopla con lo observado en las vías metabólicas relacionadas a la obtención de energía, donde los hongos mantienen encendidas las vías relacionadas al metabolismo intermediario, generando a partir de los monómeros obtenidos por la degradación de las macromoléculas antes mencionadas, los sustratos necesarios para la obtención de ATP a través del proceso de respiración celular.

Como resultado del análisis con la base de datos antes mencionada, se identificó la cepa de *Candidatus Phytoplasma solani*, que se caracteriza por ser una bacteria biotrófica que provoca enfermedades importantes en palmas cocoteras, caña de azúcar y la vid, entre otras. La actividad metabólica de esta cepa es muy baja en la mayoría de las vías y complejos analizados, sugiriendo que ese efecto es debido a que funge como parásito obligado (Zambon *et al.*, 2018), por lo que su incidencia y baja actividad metabólica se debe a su presencia en el agua residual analizada.

En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, se observa una baja actividad metabólica, esto debido a la interacción de diversos factores. Es conocido que esta especie predomina en el medio marino; sin embargo, no es ajena a nichos donde hay agua dulce, e incluso, agua residual (Ledda *et al.*, 2015). Lo anterior es presentado en las circunstancias del presente trabajo, bajo la influencia del lugar de muestreo, que, si bien se realizó en un arroyo, este presentaba un flujo característico suave, lo que permitía que el agua estancada acumulara nutrientes y oportunidad para el desarrollo de esta cepa en condiciones diferentes a las que, comúnmente, debería estar para crecer (Chew *et al.*, 2018).

En el caso de las aguas residuales, estas, bajo ciertas circunstancias, pueden ofrecer un servicio ambiguo en relación al efecto de los nutrientes presentes y el desarrollo de la comunidad microbiana presente en el medio; si bien la presencia de altas cantidades de nitrógeno y fósforo benefician el crecimiento de las algas (eutroficación), este fenómeno puede volverse un factor antagonista en el mismo rubro. La complejidad de la comunidad

microbiana del agua residual es amplia, donde la presencia de especies antagonistas o depredadoras forman parte activa de la misma; por lo que, se sugiere que la conjunción de los factores ambientales ajenos al nicho ideal de *N. gaditana*, la presencia de microorganismos con potencial de sintetizar y liberar sustancias con efecto antagonista, y la presencia de predadores pudo influir en la baja actividad metabólica, y en sus componentes celulares, resultante del análisis realizado en el presente trabajo (Chen *et al.*, 2010; Moed *et al.*, 2015).

La cantidad de sales presentes en el agua pueden influir, por su capacidad de ionización, sobre la capacidad de esta para conducir la electricidad y como factor relacionado a la dureza del agua. Se considera agua muy blanda a aquella que ronda entre los 0 y 140 mS, siendo el agua dura aquella que registra rangos entre los 640 y 840 mS (Pérez y Merad, 2011). La NOM-CCA-031-ECOL-1993 marca como límite permisivo los 8 mS en aguas utilizadas para descarga, que, al comparar con el resto de los tratamientos, se observó que la totalidad de ellos están por debajo de ese límite, siendo los tratamientos con ambas microalgas, cultivadas bajo condiciones de luz y ambas condiciones, las que presentan mayor capacidad para asimilar las sales presentes en el agua. Una explicación del este fenómeno radica en la capacidad de las microalgas para asimilar el amonio e incorporarlo al metabolismo de aminoácidos mediante distintas enzimas como la glutamato deshidrogenasa (GDH), glutamina sintetasa (GS) y el complejo glutamato sintetasa (GOGAT) (De-Bashan *et al.*, 2008); de manera complementaria, la fotosíntesis le permite a la microalga fijar CO₂, sintetizar gliceraldehído-3-fosfato como fuente de nutrientes y la capacidad de asimilar diversos componentes del medio (Ting *et al.*, 2017), por lo que la aplicación de luz en esos tratamientos pudo potenciar la asimilación de sales en el agua tratada.

El agua potable se caracteriza por estar libre de turbidez, en otras palabras, estar libre de sólidos suspendidos arcillas, arena, colides, residuos orgánicos de plantas y animales, y microorganismos (Guzmán *et al.*, 2013); lo anterior indicando que el agua antes y después de tratar presentaban algunos de estos componentes. Según lo estipulado por la NOM-127-SSA-1-1994, el agua tratada debe tener, como límite máximo, 5 FTU de turbidez. Se observa que el control negativo, que es aquel que no recibió inóculo, registra 9.84 FTU, estando por encima de los límites permisibles de la norma caso no presentado en la *C. sorokiniana*

cultivada bajo condiciones de luz y agitación, por separado; registrándose una turbidez menor, estadísticamente, en la *C. vulgaris* cultivada bajo condiciones de luz.

Con relación a los contaminantes inorgánicos, diversas especies de microalgas los asimilan mediante el metabolismo autótrofo; aunado a eso, tienen la capacidad de asimilar grandes cantidades de fósforo y nitrógeno, principalmente en forma de nitritos y urea (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2017); donde diferentes especies de *Chlorella* tienen la capacidad de asimilar y remover nutrientes y contaminantes procedentes de aguas residuales agrícolas (*C. zofingiensis*) (Zhu *et al.*, 2013) y urbanas (*C. vulgaris*) (Wang *et al.*, 2010a); explicando así la disminución de los contaminantes en el agua. La presencia de microorganismos es un factor que definitivamente influye en la turbidez del agua, sin embargo, metabólicamente, juegan un papel importante en el proceso de remediación del agua.

La remoción de materia orgánica se ha reportado potenciada cuando la interacción de las bacterias con las microalgas promueve dos actividades principales: i) mineralización de la materia orgánica (nutrición microbiana heterótrofa), y ii) promoción de crecimiento hacia microalgas por la liberación de auxinas, citosinas, ácido jasmónico, entre otros (Wang *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2010).

Otro mecanismo metabólico con el que las microalgas, entre ellas *C. vulgaris*, pueden remover materia orgánica es el mecanismo mixotrófico, donde la combinación de la fotosíntesis con la nutrición celular heterótrofa ha demostrado ser eficiente en la remoción de compuestos orgánicos como urea, glicerol, ácido acético, glucosa, xilosa, entre otros (Bhatnagar *et al.*, 2011), fomentando así la disminución de la turbidez en el agua tratada.

El pH para el funcionamiento óptimo de los sistemas biológicos fluctúa entre 6.5-8.5. Al inicio del bioproceso, el pH del agua a tratar era de 8.35, no encontrando diferencias significativas entre el resto de los tratamientos, aún cuando el pH se incrementó en *C. sorokiniana* con luz y agitación y *C. vulgaris* cultivada bajo ambas condiciones y bajo condiciones de luz. El pH influye sobre el tratamiento de aguas principalmente en dos aspectos: i) en la actividad enzimática y biológica del microorganismo, y ii) en la solubilidad de los contaminantes; influyendo así en la efectividad en la biorremediación. En un sistema cerrado, como el que se presenta en este trabajo, la variación del pH no es significativa, pero en otros casos es necesario tenerlo en cuenta. En el caso de las aguas contaminadas con antibióticos, existen algunos que presentan varios estadios de protonación, con relación al

pKa que tiene la molécula; influyendo así en su solubilidad. A pH cercanos 6-7 las tetraciclinas no presentan cargas, facilitando la absorción por el lodo activado; de la misma forma, el pH influye sobre la hidrofobicidad del norfloxacino, siendo baja a pH cercano a 4, más soluble en comparación cuando se registran pH superiores a 9 (Cirja *et al*, 2008).

El oxígeno disuelto está estrechamente relacionado con la remoción de nutrientes y contaminantes por medio de la oxidación microbiana, manteniendo los sólidos suspendidos para este fin; siendo 2 mg/L lo deseado para una correcta remoción de nutrientes en el tratamiento de aguas con lodos activados (Pittoors *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que 1 mg/L equivale a 1 ppm, el oxígeno disuelto antes de iniciar el bioproceso fue de 2.8 ppm, siendo una oxigenación baja pero útil para la biorremediación; en el caso del agua tratada con *C. vulgaris* en agitación, *C. sorokiniana* con luz y agitación, *Penicillium* sp. y el control negativo, que se caracteriza por solo poseer la microbiota característica del agua muestreada, presentaron un rango de DO de 7.287-7.74; parámetros aceptables para el desarrollo de la vida marina.

La remoción de materia orgánica se ve influenciada por el tipo de metabolismo inducido en las microalgas. Se considera una nutrición autotrófica aquella donde la microalga utiliza materia inorgánica y luz para transformarla en materia orgánica, como producto de esta vía se genera iones hidroxilos, radicales que influyen sobre el pH.

Por otra parte, la nutrición heterotrófica implica el uso de materia orgánica para la obtención de energía, esto cuando bajo el ciclo oscuro de la fotosíntesis, de manera que, a la combinación de ambos procedimientos, se le conoce como metabolismo mixotrófico (Kim *et al*, 2013). Lo anterior tiene sus ventajas y desventajas. El primero se caracteriza por presentar una alta remoción de N y P, aunado a la fijación de CO₂; sin embargo, el rango de crecimiento es más lento. Un punto en contra de la nutrición heterótrofa/ mixotrófica es el incremento en el riesgo de contaminación bacteriana por la presencia de los compuestos orgánicos generados; sin embargo, la combinación de estímulos e inducción de dichos procesos bioquímicos puede reducir las ventajas presentes en ambas (Chen, 1996; Yang *et al*, 2000). Al comparar los tratamientos no existe una diferencia estadística entre todos los tratamientos, sin embargo, los datos más bajos pertenecientes al rango en el que se encuentran todos los datos corresponden a la *C. sorokiniana* cultivada bajo condiciones de agitación, y

la combinación de condiciones; fenómenos observado de igual manera en la determinación de nitrógeno (Ballesteros-Torres *et al.*, 2019)

La demanda química de oxígeno se define como la cantidad de oxígeno consumido debido a la oxidación de la materia orgánica por medio de un método químico, donde la NOM- 001- SEMARNAT- 1996 establece un límite de 210 mg/L como valor inmediato. Ambas cepas cultivadas bajo condiciones de agitación (*C. sorokiniana* en agitación = 85 mg/mL; *C. vulgaris* con agitación = 91.3 mg/mL) presentaron niveles significativamente más bajos que lo establecido por la norma, el T0 (335 mg/mL) y el control negativo (406.67 mg/mL), estos últimos dos superando de manera significativa lo establecido por la norma. La disminución en los niveles de la DQO confirma la capacidad de los tratamientos para asimilar la materia orgánica presente en el agua, confirmando a su vez, la capacidad de ambas cepas de asimilar dicha materia, muy probablemente por la inducción de un metabolismo heterótrofo; tal como se ha reportado por Singh *et al.* (2017) y Eladel *et al.* (2019), al tratar agua residual municipal y urbana.

De manera conjunta, se define a la demanda bioquímica de oxígeno como la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar materia orgánica presente en el agua, fenómeno dado por la acción microbiana. El monitoreo de este parámetro es útil para entender la presencia y abundancia de los tipos de organismos con relación a su tipo de respiración, de manera que, la presencia de oxígeno promoverá la vida microbiana aerobia, encargada de remover por oxidación la materia orgánica contaminante; a su vez, el monitoreo de este permite verificar que el procedimiento no ingrese a una fase de anaerobiosis, lo cual podría desencadenar un proceso de eutroficación (Abdel-Raouf *et al.* 2012). El límite permisible de DBO en ríos de uso urbano, en su promedio diario, es de 150 mg/mL (NOM-001-SEMARNAT-1996). La determinación de la DBO en la totalidad de los tratamientos es significativamente menor a la del límite permisible. El tratamiento de *C. vulgaris* con agitación (21.13 mg/mL), en contraste lo determinado en el tratamiento con *C. vulgaris* con luz y agitación (44.97 mg/mL) y T0 (48.8 mg/mL), es significativamente menor; estos últimos, sin embargo, no presentan diferencias estadísticas entre ellos.

Los límites permisibles correspondientes a la determinación de grasas y aceites totales es de 25 mg/L (NOM-001-SEMARNAT-1996), valor estadísticamente similar con relación al tratamiento de *C. vulgaris* cultivada bajo condiciones de luz (5.6 mg/L), y ambas a la vez

(8 mg/L); en contraste con lo observado en el tratamiento de *C. sorokiniana* con luz (190.5 mg/L) y *C. sorokiniana* con luz y agitación (191.5 mg/L) que son significativamente mayores a lo determinado en el tratamiento de *C. vulgaris*, y lo establecido como límite permitido, sin embargo, el control negativo arrojó una cantidad de 399.33 mg/L, siendo la mayor determinación en la totalidad de los tratamientos. La presencia de estos compuestos orgánicos en el agua le confiere mayor dificultad al proceso de tratamiento de aguas. Son moléculas que proceden de distintas fuentes, siendo la más común la procedencia de residuos alimentarios, donde la presencia de natas o espumas son indicio de la presencia de estos contaminantes, haciendo que el tratamiento biológico y fisicoquímico sea menos eficaz (Olivo *et al.*, 2010).

Se plantea que la acción conjunta de organismos heterótrofos y autótrofos la responsable de la de la remoción de compuestos orgánicos presentes en el agua. La presencia de bacterias conlleva un metabolismo aerobio, el cual, genera CO₂, que aunado al fijado durante el ciclo del Calvin, es aprovechado por la microalga para el proceso fotosintético; por otra parte, los residuos nitrogenados, procedentes del carbono y del fósforo, que son el resultado de la respiración celular aerobia bacteriana, son incorporados a la microalga como compuestos orgánicos residuales, los cuales influyen en el crecimiento de la microalga, la generación de biomasa, y potencialmente, la acumulación de sustancias de interés (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017).

Si bien la asimilación de CO₂ es un proceso importante en el metabolismo celular, otros factores influyen en la dirección metabólica celular. Según lo reportado por Juneja *et al.* (2013), el pH es un factor que influye sobre la acumulación de lípidos en diversas especies de microalgas. Se sugiere este mecanismo bioquímico debido a que, a un pH de 8.2, el 90% del CO₂ es convertido a HCO₃⁻¹, el 1% es CO₂ molecular y el 9% restante se encuentra en forma de bicarbonato; dichas condiciones direccionan a especies de microalgas como *Emiliania huxleyi* y *Dunaliella salina* a la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados; fenómeno posiblemente sucedido en las especies de *Chlorella* evaluadas.

En el caso de las proteínas en el agua residual se toma en cuenta el nitrógeno contenido en la misma, siendo este un factor importante sobre el metabolismo de los organismos que se encuentran presente en la compleja comunidad microbiana presente en el medio. Wang y Park (2015) reportaron diferencias entre dos microalgas *wildtype*

pertenecientes a los géneros *Micractinium* y *Chlorella*, lo anterior al someterlas a un crecimiento aerobio, en agua residual con alto contenido de nitrógeno, y posteriormente en un proceso anaerobio bajo condiciones mesofílicas; diferenciándose en la producción de proteínas extracelulares, siendo mayor la producción en *Micractinium*; sin embargo, bajo las condiciones anaerobias subsecuentes al proceso, se determinó una mayor cosecha de metano en el proceso tratado con *Chlorella* (230 dm³/kg) que en tratado con *Micractinium* (209 dm³/kg); esto como producto de la degradación de lípidos, polisacáridos y proteínas. Dado lo anterior es posible atender problemas ambientales de manera simultánea, como es el tratamiento de aguas anaerobio, la producción de biocombustible con uso potencial y la obtención e inyección de CO₂, este como producto del uso del biocombustible previamente generado, para la producción de biomasa (fuente de energía renovable) bajo condiciones aerobias (caso particular de la producción de biomasa de microalgas).

Phukan *et al.* (2011) proponen el uso de microalgas como materia prima para diversos rubros, entre ellos la alimentación; lo anterior basándose en la facilidad para su cultivo y su capacidad para fijar CO₂; además, reportó características fisicoquímicas de una *Chlorella* sp catalogada como MP-1; elucidando una baja producción de biomasa (5.93%) pero alta energía (18.59 MJ/kg), refiriéndose esto último a la cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas contenidas; refiriendo así su potencial uso para la alimentación y la producción de combustibles sustentables de segunda generación.

Complementando el tratamiento de aguas con el contenido químico del agua a tratar, esto al usarse como medio de cultivo, Ji *et al.* (2014) evaluaron el efecto del agua residual de glutamato monosódico sobre el crecimiento y composición bioquímica de *C. vulgaris* bajo condiciones mixotróficas. Previo a su utilización, en medio fue diluido en una razón 1:2, partiendo de una dilución de 1/25, hasta llegar a una dilución 1/800; utilizando medio BG11 como control. El crecimiento bajo la dilución 1/100, arrojó una mayor concentración de biomasa y una mayor productividad (1.02g/L y 61.47 mg/L d; respectivamente); en el caso de los componentes bioquímicos, se observó una alta cantidad de proteínas, en contraste con lo obtenido en lípidos y carbohidratos; elucidándose proteínas con potencial nutricional y ácidos grasos poliinsaturados, potencialmente usados para el mismo propósito. Dichos resultados, contrastados con los obtenidos en el presente estudio, difieren en cantidades considerables, donde los obtenidos, en cuestión de concentración de biomasa, son menores

en ambas cepas estudiadas. De manera similar, pero utilizando agua residual de origen doméstico, Miao *et al.* (2016), demostró que *C. vulgaris* presenta buenos índices de crecimiento, remoción de contaminantes y producción bioquímica con interés nutricional; que, al contrastarlo con el presente estudio, *C. sorokiniana* es la que presenta mayor concentración y rendimiento de biomasa que la *C. vulgaris*; sin embargo, ambos con menor producción a lo antes mencionado.

Existen pocas evidencias del uso de *B. subtilis* en el tratamiento de aguas, sin embargo, hay reportes que evidencian el uso sinérgico entre microalgas y bacterias heterotróficas, teniendo en cuenta que los nutrientes presentes pueden influenciar el comportamiento de estas asociaciones microbianas, tal es el caso de *Scenedesmus* y *C. vulgaris* en conjunto con *Raoultella terrigena* y *Pantoea agglomerans*, que presentan actividad remediadora enfocada a remover compuestos fenólicos (Maza-Máquez *et al.*, 2014). Por otra parte, y enfocándose a estudios relacionados a *Bacillus* sp., Ewida (2020) reportó la actividad remediadora de organismos autóctonos del agua residual del proceso del maíz, encontrando tres especies de *Bacillus* (*subtilis*, *amyloliquefaciens* y *licheniformis*), y *Saccharomyces cerevisiae*. La reducción de materia orgánica fue notable en la expresión de DQO (12000 a 430 mg/L) y DBO (9000 a 220 mg/L), observándose a su vez un incremento en la comunidad bacteriana de 2×10^6 a 4×10^{10} . Lo anterior indica una actividad asimiladora de nutrientes en agua residual; contrastando con lo sucedido en el presente estudio, la materia orgánica del agua muestreada no estaba presente en esos niveles tan altos; sin embargo, fue posible mantener los niveles de los parámetros fisicoquímicos relacionados a la calidad del agua por debajo de los límites permisibles; esto teniendo en común cepas de *Bacillus*, diferenciándose con el proceso bioquímico entre autótrofos y heterótrofos.

Existen evidencias de la efectividad de la conjunción entre microalgas y bacterias, donde *C. sorokiniana* en conjunción con bacterias, utilizadas en una matriz para su inmovilización, presentan la capacidad de degradar compuestos orgánicos como salicilato y aceite (Bharagava y Saxena, 2020), podría sugerirse que lo acontecido en el presente estudio es respaldado por acción remediadora conjunta entre bacterias y microalgas, a pesar de no presentar un proceso de inmovilización.

Por otra parte, aunque de manera distinta a la conjunción con organismos autótrofos, existen evidencias que *B. subtilis* se ha utilizado en procesos de biorremediación de diésel

(Zhang *et al.*, 2014), y procesos independientes donde se induce un proceso de respiración anóxica (Sandhya *et al.*, 2005), sin embargo, dentro de la búsqueda realizada para sustentar el presente estudio, no se encontró un mayor número de evidencias del uso de *B. subtilis* en el tratamiento de aguas residuales, bajo condiciones parecidas a las expuestas en este proyecto. Dentro del género *Bacillus*, se han reportado las actividades sinergistas entre especies de *C. vulgaris* y *Bacillus licheniformis*, y *Azospirillum brasilense*, asociaciones capaces de asimilar y remover compuestos fosforados y nitrogenados (Liang *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2018). No solo *Bacillus* se ha utilizado en conjunto con microalgas para el tratamiento de aguas. Makut *et al.* (2019) reportaron la utilización de consorcios heterótrofo-autótrofo entre dos cepas bacterianas, *Klebsiella pneumoniae* (ORWB1) y *Acinetobacter calcoaceticus* (ORWB3), en conjunción con *C. sorokiniana* (DBWC2) y *Chlorella* sp. (DBWC7). Ambos conjuntos se evaluaron en aguas residuales crudas y artificiales (humedales). Dentro del estudio se evaluaron parámetros enfocados a la calidad del agua, donde la remoción de nitrógeno y la demanda química de oxígeno presentaron una remoción del 93.59 y 82.27%, respectivamente, en el caso de los humedales, y 84.69 y 90.94%, respectivamente, en el caso del agua residual cruda; indicando que la utilización de bacterias y microalgas es útil para el tratamiento de aguas; fenómeno observado en el presente estudio, donde en la totalidad de los tratamientos, los niveles de parámetros estudiados permanecieron bajo los niveles normales, esto en relación a las normas oficiales mexicanas.

La conjunción de microalgas con lodos activados (comunidad microbiana amplia y variada), usando agua residual como medio de cultivo, bajo condiciones de luz, demostró una actividad remediadora altamente eficiente, esto teniendo en cuenta los compuestos orgánicos oxidables y nitrógeno (100% DQO y 87.13%), aunado a esto, se determinó que, dentro de la misma comunidad microbiana, había bacterias que producían componentes como el ácido indolacético, que funge como promotor de crecimiento de plantas, promoviendo así el crecimiento de las microalgas (Chen *et al.*, 2019a), fenómeno presentado de manera similar en el estudio presente, donde los niveles de nitrógeno y materia orgánica se mantuvieron bajo los niveles normales el tiempo total del proceso continuo de tratamiento, y los tratamientos aplicados en condiciones no estériles bajo con la aplicación de luz, arrojaron una mayor cantidad de biomasa de microalgas, posiblemente por una acción bioquímica explicada con anterioridad.

Otra evidencia relacionada es la actividad remediadora por una combinación de cepas subárticas de *C. vulgaris* 13-1 y *Rhizobium* sp, donde la acción conjunta bajo condiciones estables promovió una mejor remoción de carbón orgánico total (50%), y nitrógeno total (56%); aunado a esto, también disminuyó el tiempo hidráulico de retención de 7 a 3 días, de manera que el consorcio incrementó la efectividad en la remoción de contaminantes (Ferro *et al.*, 2019). Reforzando lo descrito anteriormente, otras evidencias exponen la capacidad de *C. vulgaris* de degradar ciertos colorantes a aminas aromáticas, asimilables para bacterias (Marungrueng y Pavasant, 2007); remoción de compuestos nitrogenados y fosforados (He *et al.*, 2013); asimilación de componentes presentes en aguas agrícolas (Franchino *et al.*, 2013). Lo anterior se sustenta debido a previos reportes que exponen la capacidad de los microorganismos para formar consorcios, lo cual se considera sucede en cuatro etapas:

1) Adsorción. La bacteria se une a la superficie de la microalga, y la producción de exopolisacárido (EPS) inicia un proceso de unión.

2) Anclaje de la bacteria sobre la superficie de la microalga.

3) Distribución de los microorganismos unidos en la biomasa generada y precipitada.

4) Formación del consorcio maduro (Madakka *et al.*, 2019).

Bajo el supuesto que el consorcio entre algas y bacterias se haya establecido correctamente, se propone un desarrollo simbiótico entre ambos organismos, propiciando en el ambiente del agua residual efectos como mineralización de materia orgánica por la oxidación de la misma por parte de la bacteria, asimilando el oxígeno fotosintético liberado por la microalga; mejoras en el proceso de oxigenación, remoción de contaminantes, disminución en la emisión de gases con efecto invernadero; esto como producto de una suplementación mutua de nutrientes, vitaminas y otros compuestos (Su *et al.*, 2012).

Las aguas residuales procedentes de diversas fuentes industriales son de especial interés, ya que puede existir el riesgo ser contaminantes que impactan al ambiente de manera adversa. Yang *et al.* (2011a) realizaron un estudio donde evaluaron el potencial remediador de *Penicillium* sp. frente a tinte de trifenilmetano, compuesto xenobiótico altamente recalcitrante, liberado comúnmente al ambiente. Con la aplicación de un diseño Box-Behnken, se establecieron las condiciones óptimas de cultivo, siendo estas la concentración de sucrosa (9.02 g/L), pH inicial (6.0), y una concentración del inóculo (3.5 g, peso húmedo). Se observó que un 98.23%, correspondiente a un total de 25 mg/L, fue removido después de

6 días de proceso. Aunado a esto, se elucidó la actividad enzimática relacionada a la biotransformación del xenobiótico, observándose 2, 6-dicloro-fenolindofenol, dependiente de NADH y actividad ligninperoxidasa. Los factores antes mencionados proponen el uso potencial de *Penicillium* en el tratamiento de aguas industriales procedentes de la manufactura de colorantes. En comparación con el presente estudio, se propone el uso de *Penicillium* para el tratamiento de aguas procedentes de arroyos contaminados. El uso del hongo de manera individual mostró niveles de los parámetros fisicoquímicos por debajo de los límites permisibles, empatando la sugerencia del autor antes mencionado y lo obtenido en este proyecto, con el potencial del hongo como organismo remediador de agua. En el tratamiento de aguas se ha observado remoción de cobre (Cu II) por la acción de *P. citrinum*, lo anterior cuando la cepa es inmovilizada en camas de alginato, fenómeno más eficaz que la cepa no inmovilizada (Kiran *et al.*, 2018).

Si bien las evidencias encontradas en la literatura hablan del potencial de *Penicillium* en el tratamiento de algunos tipos de aguas, en la revisión del presente trabajo no se encontraron evidencias del uso de este heterótrofo en conjunto con microalgas. Se han reportado estudios donde hongos de otras especies también tienen potencial remediador para el tratamiento de agua. Walls *et al.*, (2019) evaluaron el potencial remediador y la producción de bioetanol en reactores bajo condiciones no estériles, evaluando la remoción de nitrógeno y fósforo, esto tratando el agua con una microalga (*Scenedesmus* spp.), una levadura “wild type” y la combinación de ambas. Se demostró que la actividad de la levadura presentó una remoción del 100% en el caso de nitrato y nitrógeno amoniacal, y de 92.6% de ortofosfato; siendo un poco menor, con alta eficiencia, la remoción de contaminantes en el caso de la microalga y la levadura en conjunto (96% de nitrato, 100% de nitrógeno amoniacal y 93% ortofosfato), elucidando un potencial uso de estos microorganismos en el tratamiento de aguas.

Si bien las levaduras y hongos como *Penicillium* pertenecen a grupos distintos, ambos tienen potencial para su uso en el tratamiento de aguas, las levaduras en el estudio antes mencionado y los hongos filamentosos respaldados por la actividad remediadora conjunta que se presenta en este estudio. Aunado a lo anterior, se ha observado que el uso de hongos filamentosos /ascomicetos y zygomycetos) puede estar enfocado a la producción de alimentos fermentados, siendo estos reconocidos como alimentos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Nitayavardhana y Khanal, 2010; Ferreira *et al.*,

2013), donde estos organismos, además de tener la capacidad de reducir la contaminación en cuerpos de agua y aguas residuales tratadas, su biomasa puede utilizarse como alimento, como lo observado en el presente estudio, donde en conjunción con la comunidad microbiana presente en el estudio se utilizó como suplemento para cabras.

Hay evidencias del uso de las microalgas como suplemento alimenticio en rumiantes, esto con relación a las diversas biomoléculas de interés nutricional contenidas. En el caso de los carbohidratos, los rumiantes poseen la capacidad de asimilar grandes cantidades de fibras, esto debido a su complejo aparato digestivo; en el caso de las proteínas, gran parte de ellas provienen de origen animal y vegetal; sin embargo, los rumiantes también obtienen péptidos y aminoácidos esenciales procedentes de la digestión de microorganismos presentes en el rumen; y en el caso de las vitaminas, los rumiantes requieren aquellas que son liposolubles (A, D y E), ya que el resto (complejo B y K) son obtenidas mediante los procesos de fermentación ocurridos en el rumen (Flórez-Miranda *et al.*, 2015). Kholif *et al.*, (2016) reportaron el uso de *C. vulgaris* como complemento alimenticio en cabras de la raza Damasco, donde la ingesta diaria de 5-10 g al día, durante 12 semanas, presentó fenómenos positivos en las cabras, como una mejora en la digestibilidad, la producción de ácidos grasos volátiles y ácido propiónico, pero se observó una disminución en la actividad transaminasa de intermediarios del ciclo de Krebs y en las concentraciones de colesterol en sangre; por otra parte, se observó mejoría en la calidad de los componentes de la leche en aspectos como la producción, la concentración de ácidos grasos poliinsaturados; concluyendo que la utilización de *C. vulgaris* en la dieta de cabras proporciona beneficios para estos animales.

En el presente estudio, se analizaron de manera cualitativa algunos aspectos bioquímicos y físicos de cabras Sannen, donde se encontró un incremento de peso en cabras tratadas con la combinación de microalgas *Chlorella*, de las especies *vulgaris* y *sorokiniana*, y organismos heterótrofos (*B. subtilis* y *Penicillium* sp), esto en relación al control; aunado a esto, se observó un incremento en los niveles de colesterol y triglicéridos del total de las cabras (tratadas y control), probablemente fenómeno de acumulación de energía por la etapa de destete en la que se encontraban. Lo anterior debido a evidencias publicadas donde la adición de esta biomasa mejora la actividad de fermentación dentro del rumen (Kholif *et al.*, 2017). Otra evidencia a favor del incremento de colesterol y triglicéridos en sangre se presenta como consecuencia de una buena nutrición que provoca balances energéticos

positivos (Posada *et al.*, 2012). Con el objetivo de entender aún más los efectos de la suplementación alimenticia de cabras con *Chlorella* sp, Tsiplakou *et al.*, (2017) realizaron un estudio en cabras lecheras cruzadas, donde evaluaron la actividad enzimática metabólica y con actividad antioxidante, además de componentes químicos de la leche. Reportaron que la aplicación de *C. vulgaris* demostró un incremento en la actividad de superóxido dismutasa y catalasa (10.31% y 18.66% más alta), en el plasma de las cabras tratadas, esto al compararlas con aquellas no tratadas; aunado a esto, se observó una reducción de carbonilos protéicos, llegando a la conclusión que, el uso de *C. vulgaris*, presenta potencial antioxidante, por tanto, adecuada para su uso como suplemento alimenticio; por otra parte, se han observado evidencias que el uso de *C. pyrenoidosa* no presenta efectos significativamente diferentes en la calidad de leche, calostro y estatus inmunológico del animal, en relación al grupos establecido como control; lo anterior en cabras Majoreras (Moreno-Indias *et al.*, 2014). De manera similar a lo reportado anteriormente, Morales-de la Nuez *et al.* (2014) no encontraron cambios significativos tanto en crecimiento como en la ingesta de sustituto de leche, esto en cabras y ovejas al suplementarlas con *Chlorella* sp.

El potencial nutricional de estos microorganismos radica en la composición química resultante de sus procesos metabólicos. Becker (2007) reportó que cepas de *Chlorella* poseen una composición química de proteínas de hasta un 52% y 7.5% de lípidos, ambos mayores a lo reportado en el presente estudio, donde se observa una mayor producción de lípidos que de proteínas en la totalidad de los tratamientos (Tablas 8 y 9). Lo anterior debido a la inducción de un metabolismo mixotrófico en las microalgas, donde la asimilación de fuentes de carbono orgánicas (expresadas en DQO, DBO, MO) e inorgánicas (conductividad), inducen a la producción de biomoléculas como lípidos dentro de la biomasa generada; teniendo en cuenta que hay reportes que expresan las capacidades de *C. vulgaris* y *sorokiniana* de utilizar los contaminantes y nutrientes presentes en aguas residuales industriales, municipales y agrícolas (Singh *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012). Estudios relacionados han demostrado que la acumulación de lípidos en la biomasa de microalgas se presenta debido al agotamiento de nutrientes, potenciándose cuando los nutrientes se van terminando; sin embargo, el incremento de nitrógeno y fósforo ha demostrado ser también un potenciador de la producción de lípidos (Sheehan *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2014).

9. Conclusiones

1. Con base al análisis metagenómico y la determinación del índice de finalización de módulos, se concluye que la comunidad heterogénea identificada muestra actividad metabólica direccionada a la asimilación de materia orgánica presente en el agua residual.
2. *Chlorella sorokiniana* y *C. vulgaris* poseen la capacidad para asimilar sales, reflejado esto en la disminución de mS de la conductividad; sin embargo, *C. vulgaris* cultivada solo bajo luz posee la capacidad de asimilar mayor cantidad de sales (1.41 ± 0.19 mS), y reduce la conductividad del agua tratada de forma más eficiente sin requerir agitación.
3. El proceso de agitación en el control negativo, *C. vulgaris* en agitación, y *C. sorokiniana* con luz y agitación influyen sobre una correcta saturación de O₂, promoviendo así la remoción de contaminantes y nutrientes, mayormente marcada en las microalgas debido a la inducción de metabolismo mixotrófico.
4. Ambas microalgas bajo condiciones de agitación estimulan la remoción de nutrientes, determinado por la reducción de las demandas química y bioquímica de oxígeno.
5. *C. sorokiniana* cultivada bajo luz y agitación mostró mayor producción de biomasa que *C. vulgaris*.
6. *C. vulgaris* posee mayor capacidad de asimilar grasas y aceites contaminantes que *C. sorokiniana*.
7. De manera cualitativa, la totalidad de las cabras suplementadas con biomasa obtenida del proceso de saneamiento presentan niveles de triglicéridos y colesterol en sangre superiores a los valores normales, signo benéfico en la salud de las cabras en esa etapa de desarrollo.
8. De manera cualitativa, las cabras suplementadas con *C. vulgaris* + *B. subtilis* con luz; y *C. vulgaris* + *Penicilium* sp. con luz, incrementaron su peso un 11% (0.5 kg) y un 7% (0.2 kg), respectivamente, comparado con el control negativo.

10. Perspectivas

La cantidad de grasas y proteínas de la biomasa obtenida de la comunidad microbiana del proceso de saneamiento de aguas residuales a nivel de biorreactor no presentó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Aunado a esto, la totalidad de los tratamientos presenta porcentajes muy por debajo a lo reportado en alimentos balanceados, por lo que se sugiere realizar estudios en donde se evalúe su uso complementario.

Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., y Ibraheem, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 19(3), 257-275.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abinandan, S., y Shanthakumar, S. 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: a review. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 52, 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086>
- Ahluwalia, S. S., y Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Biores. Technol*, 98(12), 2243-2257. *Bioresour. Technol.* 98, 2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., y Martini, M. 2018. Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality-A review. *Livestock Sci.* 214, 25-35.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.05.006>
- Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Küpper, F. C., Sunda, W. G., y Carrano, C. J. 2009. Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *PNAS.* 106(40), 17071-17076. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905512106>
- Avagyan, A. B. 2010. New design & build biological system through the use of microalgae addressed to sustainable development. *J. Environ. Prot.* 1(02), 183.
DOI:[10.4236/jep.2010.12023](https://doi.org/10.4236/jep.2010.12023)
- Azov, Y., y Goldman, J. C. 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 735–739.
<https://aem.asm.org/content/43/4/735.short>
- Bailly-Bechet, M., A. Danchin, M. Iqbal, M. Marsili y M. Vergassola. 2006. Codon usage domains over bacterial chromosomes. *PLoS Comput. Biol.* 2:e37.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020037>
- Ballesteros-Torres, J.M., Samaniego-Moreno, L., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R.S., Rodríguez-Padilla, C., y Tamez-Guerra, P. 2019. Amino acids and acylcarnitine production by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* microalgae from wastewater culture. *PeerJ* 7:e7977. <http://doi.org/10.7717/peerj.7977>

- Bartossek, R., G. W. Nicol, A. Lanzen, H. P. Klenk y C. Schleper. 2010. Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environ. Microbiol.* 12, 1075–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02153.x>
- Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., y López-Chuken, U. J. 2017. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 52(3), 417-427. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>
- Bentley, S. D., y Parkhill, J. 2004. Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 771-791. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.094318>
- Bharagava, R. N., y Saxena, G. (Eds.). 2020. Bioremediation of industrial waste for environmental safety. doi:10.1007/978-981-13-3426-9
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., y Das, K. C. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Ener.* 88(10), 3425-3431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064>
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., et al. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell.* 22(9), 2943-2955. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076406>
- Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Munoz, R., Hatti-Kaul, R., et al. 2003. Synergistic relationships in algal–bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresour. Technol.* 86, 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00074-3)
- Briones, A., y Raskin, L. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Op. Biotechnol.* 14(3), 270–276. DOI:10.1016/s0958-1669(03)00065-x
- Cabanelas, I. T., Ruiz, J., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Garrido-Pérez, C., et al. 2013. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal

- production and nutrient removal. *Bioresour. Technol.* 131, 429–436.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.152>
- Cai, T., Park, S. Y., y Li, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 19, 360-369.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Cheirsilp, B., Suwannarat, W., y Niyomdecha, R. 2011. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnol.* 28, 362–368.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.004>
- Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* 14, 421–426. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10060-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10060-3)
- Chen, X., Hu, Z., Qi, Y., Song, C., y Chen, G. 2019a. The interactions of algae-activated sludge symbiotic system and its effects on wastewater treatment and lipid accumulation. *Biores. Technol.* 292, 122017.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122017>
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., et al. 2010. Review of biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *Inter. J. Agr. Biol. Eng.* 2(4), 1-30.
DOI: 10.3965/j.issn.1934-6344.2009.04.001-030
- Chen, J., Yang, Y., Liu, Y., Tang, M., Wang, R., et al. 2019b. Bacterial community shift in response to a deep municipal tail wastewater treatment system. *Biores. Technol.* 281, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.099>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., y Chang, J. S. 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: a review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 91, 332-344.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, T. Y., Chang, Y. B., Kuo, C. M., y Lin, C. S. 2015. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Biores. Technol.* 184, 179-189.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080>
- Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A., y Corvini, P. F. 2008. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP)

- and membrane bioreactors (MBR). *Rev. Environ. Sci. Bio/Tech.*, 7, 61-78.
<https://doi.org/10.1007/s11157-007-9121-8>
- Clijsters, H., y Vanassche, F., 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 7, 31–40. <https://doi.org/10.1007/BF00032920>
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., y Smith, A. G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature.* 438, 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aleman-Nava, G. S., Chandra, R., Garcia-Perez, J. S., Contreras-Angulo, J. R., et al. 2017. Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Res.* 24, 438-449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.018>
- Daniel, R. 2004. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Op. Biotechnol.* 15(3), 199-204.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.005>
- De-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., y Bustillos, J. J. 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48, 514–521. <https://doi.org/10.1139/w02-051>
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Morey, T., y Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38(2), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.022>
- De-Bashan, L. E., Magallon, P., Antoun, H., y Bashan, Y. 2008. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*¹. *J. Phycol.* 44(5), 1188-1196.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00572.x>
- De Godos, I., Blanco, S., Garcia-Encina, P.A., Becares, E., y Munoz, R. 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at

- high loading rates. *Bioresour. Technol.* 100, 4332–4339.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.016>
- Delgado-Gardea, M. C. E., P. Tamez-Guerra, R. Gomez-Flores, M. Garfio-Aguirre, B. A. Rocha-Gutiérrez, et al. 2019. Streptophyta and acetic acid bacteria succession promoted by brass in slow sand filter system Schmutzdeckes. *Scientific Rep.* 9:7021.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43489-9>
- Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., y Das, D. 2019. Microalgae–nutritious, sustainable aqua-and animal feed source. *J. Funct. Foods.* 62, 103545.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545>
- Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohmmmed, S., Radwan, A., y Abdelrahim, H. 2019. Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. *Bioprocess Biosys. Eng.* 42(3), 425-433. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2046-5>
- Ewida, A. Y. 2020. Bio-treatment of maize processing wastewater using indigenous microorganisms. *Sust. Environ. Res.*, 30(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s42834-020-0044-1>
- Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., Edebo, L., y Taherzadeh, M. J. 2013. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Biores. Technol.* 135, 523-532.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.064>
- Ferreira, J. A., Varjani, S., y Taherzadeh, M. J. 2020. A critical review on the ubiquitous role of filamentous fungi in pollution mitigation. *Cur. Poll. Rep.* 1-15.
<https://doi.org/10.1007/s40726-020-00156-2>
- Ferrer, M., Ghazi, A., Beloqui, A., Vieites, J. M., López-Cortés, N., et al. 2012. Functional metagenomics unveils a multifunctional glycosyl hydrolase from the family 43 catalysing the breakdown of plant polymers in the calf rumen. *PloS ONE*, 7(6), e38134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038134>
- Ferro, L., Gojkovic, Z., Muñoz, R., y Funk, C. 2019. Growth performance and nutrient removal of a *Chlorella vulgaris*-*Rhizobium* sp. co-culture during mixotrophic feed-batch cultivation in synthetic wastewater. *Algal Res.* 44, 101690.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101690>

- Fierer, N., y R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*. 103, 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Flórez-Miranda, L., Martínez-Roldán, A. J., y Cañizares-Villanueva, R. O. 2015. Microalgae in livestock nutrition. En: *Microalgae and other phototrophic bacteria*, Torres-Bustillos, L. G. (Ed.), (pp 87-11). Nova Sci. Publishers Inc., New York, NY.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., y Riggio, V. A. 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, 92(6), 738-744. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>
- Friman, V. P., y Buckling, A. 2014. Phages can constrain protist predation-driven attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence in multienemy communities. *The ISME journal*, 8(9), 1820-1830. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.40>
- Fukami, K., Nishijima, T., y Ishida, Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*. 358, 185–191. <https://doi.org/10.1023/A:1003139402315>
- Gloux, K., Berteau, O., Béguet, F., Leclerc, M., y Doré, J. 2011. A metagenomic β -glucuronidase uncovers a core adaptive function of the human intestinal microbiome. *PNAS*, 108 (Supplement 1), 4539-4546. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000066107>
- Gonzalez, L.E., y Bashan, Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1527–1531. DOI:10.1128/AEM.66.4.1527-1531.2000
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., y Simões, M. 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24, 403-415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Gardes M. and Burns T.D.1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* .2: 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gross, W., I. Heilmann, D. Lenze, and C. Schnarrenberger. 2001. Biogeography of the Cyanidiaceae (Rhodophytes) based on 18S ribosomal RNA sequence data. *Eur. J. Phycol.* 36:275–280. <https://doi.org/10.1080/09670260110001735428>

- Gu, W., Miller, S., y Chiu, C. Y. 2019. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Ann. Rev. Pathol.: Mechanisms of Disease*. 14, 319-338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- Guzmán, L., Villabona, Á., Tejada, C., y García, R. 2013. Reducción de la turbidez del agua usando coagulantes naturales: una revisión. *Rev. UDCA, Actualidad & Divulgación Científica*. 16(1), 253-262. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/881>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., y Goodman, R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245–249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hass, C., Rose, J., y Gerba, C. 2014. Quantitative Microbial Risk Assessment. Available at: <http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1118145291.html> [Accessed July 10, 2020].
- He, P. J., Mao, B., Lü, F., Shao, L. M., Lee, D. J., y Chang, J. S. 2013. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Biores. Technol.* 146, 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.111>
- Higgins, B.T. y Vander-Gheynst, J. S. 2014. Effects of *Escherichia coli* on mixotrophic growth of *Chlorella minutissima* and production of biofuel precursors. *PLoS ONE*. 9, e96807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096807>
- Hu, Z., Qi, Y., Zhao, L., y Chen, G. 2019. Interactions between microalgae and microorganisms for wastewater remediation and biofuel production. *Waste Biomass Val.* 10(12), 3907-3919. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0325-7>
- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R., y Yuan, Z. 2012. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresour. Technol.* 121, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.012>
- Huisman, J., y Weissing, F. J. 2002. Oscillations and chaos generated by competition for interactively essential resources. *Ecol. Res.* 17, 175-181. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2002.00477.x>

- Ji, Y., Hu, W., Li, X., Ma, G., Song, M., y Pei, H. 2014. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Biores. Technol.* 152, 471-476.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.047>
- Ji, X., Jiang, M., Zhang, J., Jiang, X., y Zheng, Z. 2018. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. *Biores. Technol.* 247, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.074>
- Johnson, D. R., Lee, T. K., Park, J., Fenner, K., y Helbling, D. E. 2015. The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability. *Environ. Microbiol.* 17(12), 4851-4860. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12429>
- Johnson, I., Girijan, S., Tripathy, B. K., Ali, M. A. S., y Kumar, M. 2020. Algal–bacterial symbiosis and its application in wastewater treatment. En: *Emerging Technologies in Environmental Bioremediation* (pp. 341-372). Elsevier.
- Johnstone- Robertson, M., Clarke, K. G., y Harrison, S. T. L. 2008. Characterization of the distribution of glucose oxidase in *Penicillium* sp. CBS 120262 and *Aspergillus niger* NRRL- 3 cultures and its effect on integrated product recovery. *Biotech. Bioeng.* 99(4), 910-918. <https://doi.org/10.1002/bit.21642>
- Juneja, A., Ceballos, R., y Murthy, G. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies.* 6(9), 4607-4638. DOI:10.3390/en6094607.
- Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., y Todd, P. 1999. Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(2), 229-234.
<https://doi.org/10.1007/s002530051386>
- Karlin, S., J. Mra´zek, y A. M. Campbell. 1997. Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 179, 3899–3913.
DOI:10.1128/jb.179.12.3899-3913.1997
- Delgado-Gardea, M. C. E., Tamez-Guerra, P., Erosa de-la-Vega, G., Gómez-Flores, R. A., y Infante-Ramírez, M. R. 2014. Surface water microbiology characterization in Basaseachi National Park in Ocampo, Chihuahua, Mexico. *Biotechnology Summit*

2014. Santa María Huatulco, Oaxaca, Mexico, 8-10 October, 2014, 68-72.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153115316>
- Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y., Salem, A. Z. M., Barbabosa, A., Márquez, O., y Odongo, N. E. 2017. The effects of three total mixed rations with different concentrate to maize silage ratios and different levels of microalgae *Chlorella vulgaris* on in vitro total gas, methane and carbon dioxide production. J. Agr. Sci., 155(3), 494-507. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000812>
- Kholif, A. E., Morsy, T. A., Matloup, O. H., Anele, U. Y., Mohamed, A. G., y El-Sayed, A. B. 2017. Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. J. Agr. Sci. 155(3), 508-518. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000824>
- Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B., y Hwang, S. J. 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. Biores. Technol. 144, 8-13.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>
- Kiran MG., Pakshirajan K., y Das G. 2018. Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: mechanism and process optimization. J. Environ. Manag. 218, 486-496.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.020>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., y Show, P. L. 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. Food Sci. Human Well. 8(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Krienitz, L., Huss, V. A., y Bock, C. 2015. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. Trends Plant Sci. 20(2), 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>
- Krohn-Molt, I., Alawi, M., Förstner, K. U., Wiegandt, A., Burkhardt, L., et al. 2017. Insights into microalga and bacteria interactions of selected phycosphere biofilms using metagenomic, transcriptomic, and proteomic approaches. Front. Microbiol. 8, 1941. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01941>
- Lane, D. J. 1991. *16S/23S rRNA sequencing*, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10004891521>

- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., y Wong, Y. S., 1996. Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. Environ. Technol. 17, 183–189.
<https://doi.org/10.1080/09593331708616375>
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. No. 361. Food and Agriculture Organization (FAO). Génova, Italia.
- Ledda, C., Villegas, G. R., Adani, F., Fernández, F. A., y Grima, E. M. 2015. Utilization of centrate from wastewater treatment for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* biomass at pilot-scale. Algal Res. 12, 17-25.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.002>
- Lei, Y. J., Tian, Y., Zhang, J., Sun, L., Kong, X. W., Zuo, W., y Kong, L. C. 2018. Microalgae cultivation and nutrients removal from sewage sludge after ozonizing in algal-bacteria system. Ecotoxicol. Environ. Safety. 165, 107-114.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.096>
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., y Ruan, R. 2011. Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater in nutrient removal and biodiesel production. Biores. Technol. 102(8), 5138–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., y Wong, M. 2013. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. Chemosphere, 92(10), 1383-1389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.014>
- Lima, S.A.C., Castro, P.M.L., y Morais, R., 2003. Biodegradation of *p*-nitrophenol by microalgae. J. Appl. Phycol. 15, 137–142. <https://doi.org/10.1023/A:1023877420364>
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., y Prates, J. A. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. Livestock Sci. 205, 111-121.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020>
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., y Jensen, I. J. 2018. Protein determination-method matters. Foods, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Makut, B. B., Das, D., y Goswami, G. 2019. Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater

- treatment: A sustainable approach. *Algal Res.* 37, 228-239.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.020>
- Marungrueng, K., y Pavasant, P. 2007. High performance biosorbent (*Caulerpa lentillifera*) for basic dye removal. *Biores. Technol.* 98(8), 1567-1572.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.010>
- Mattison, R. G., y Harayama, S. 2001. The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 194(1), 39-45. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb09443.x>
- Maza-Márquez, P., Martínez-Toledo, M. V., Fenice, M., Andrade, L., Lasserrot, A., y González-López, J. 2014. Biotreatment of olive washing wastewater by a selected microalgal-bacterial consortium. *Inter. Biodet. Biodegr.* 88, 69-76.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.009>
- Miao, M., Yao, X., Shu, L., Yan, Y., Wang, Z., et al. 2016. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. *Inter. Biodet. Biodegr.* 113, 120-125. DOI:10.1016/j.ibiod.2016.04.005.
- Moed, N. M., Lee, D. J., y Chang, J. S. 2015. Struvite as alternative nutrient source for cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 56, 73-76.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.04.027>
- Morales-de la Nuez, A., Moreno-Indias, I., Sánchez-Macías, D., Hernández-Castellano, L. E., Suárez-Trujillo, et al. 2014. Effects of *Cryptocodinium cohnii*, *Chlorella* spp. and *Isochrysis galbana* addition to milk replacer on goat kids and lambs growth. *J. Appl. animal Res.* 42(2), 213-216. <https://doi.org/10.1080/09712119.2013.827579>
- Moreno-Indias, I., Hernández-Castellano, L. E., Torres, C., Morales-de la Nuez, A., Sánchez-Macías, D., Castro, N., y Argüello, A. 2014. Use of microseaweeds (*Chlorella pyrenoidosa*) as a probiotic in dairy goats feeding. *J. Appl. animal Res.* 42, 310-316. <https://doi.org/10.1080/09712119.2013.848535>
- Muñoz, R., Jacinto, M.S.A., Guieysse, B., y Mattiasson, B., 2005a. Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(5), 699-707. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1811-3>

- Muñoz, R., Rolvering, C., Guieysse, B., y Mattiasson, B., 2005b. Photosynthetically oxygenated acetonitrile biodegradation by an algal–bacterial microcosm: a pilot scale study. *Water Sci. Technol.* 51 (12), 261–265. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0479>
- Muñoz R., y Guieysse B. 2006. Algal-bacterial process for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40, 2799-2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Nitayavardhana, S., y Khanal, S. K. 2010. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Biores. Technol.* 101(23), 9078-9085. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.048>
- Olivo, A. V., Magallanes, M. Y. L., y Sandoval, M. G. C. 2010. Extracción de grasas y aceites en los efluentes de una industria automotriz. *Conciencia Tec.* 40, 29-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94415759007>
- Paniagua-Michel, J. De J., Morales-Guerrero, E., y Soto, J. O. 2015. Microalgal Biotechnology: Biofuels and Bioproducts. En: *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*, (pp. 1355-1370). Springer Berlin Heidelberg.
- Park, K. C., Whitney, C., McNichol, J. C., Dickinson, K. E., MacQuarrie, S., et al. 2012. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *J. Appl. Phycol.* 24(3), 339-348. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9772-2>
- Pérez B., y Merad E. 2011. Calidad, predicción y correlación entre variables de agua residual de Gómez Palacio, Durango. Tesis. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Unidad Laguna. Carrera Agronómica. Torreón, Coahuila. México
- Phukan, M. M., Chutia, R. S., Konwar, B. K., y Kataki, R. 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Appl. Ener.* 88(10), 3307-3312. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.026>
- Pimm, S. L. 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature.* 307:321-326. <https://doi.org/10.1038/307321a0>

- Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., y Temussi, F. 2002. Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnol. Lett.* 24, 2047–2051.
<https://doi.org/10.1023/A:1021367304315>
- Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Stanzione, M., y Temussi, F. 2003. Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnol. Lett.* 25, 1657–1659. <https://doi.org/10.1023/A:1025667429222>
- Pittoors, E., Guo, Y., y Van Hulle, S. WH. 2014. Modeling dissolved oxygen concentration for optimizing aeration systems and reducing oxygen consumption in activated sludge processes: a review. *Chem. Eng. Comm.* 201(8), 983-1002.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2014.883974>
- Posada, S., Noguera, R., y Bedoya, O. 2012. Perfil metabólico de cabras lactantes de las razas Saanen y Alpina. *Livestock Res. Rural Develop.* 24(10).
<http://www.lrrd.org/lrrd24/10/posa24182.htm>
- Qiu, Y., Zu, Y., Song, C., Xie, M., Qi, Y., Kansha, Y., y Kitamura, Y. 2019. Soybean processing wastewater purification via *Chlorella* L166 and L38 with potential value-added ingredients production. *Biores. Technol. Rep.* 7, 100195.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100195>
- Ramalho R. S. 1977. *Introduction to Wastewater Treatment Processes.* (pp. 318–320). Academic Press, New York, NY.
- Ramalho, R. S., Beltrán, D. J., y de Lora, F. 1990. *Tratamiento de Aguas Residuales.* (pp 10-23). Editorial Reverté, S. A. España.
- Reyna-Martínez, R., Gomez-Flores, R., López-Chuken, U. J., González-González, R., Fernández-Delgadillo, S., y Balderas-Rentería, I. 2015. Lipid production by pure and mixed cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175(1), 354-359.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1275-6>
- Robledo-Zacarías, V. H., Velázquez-Machuca, M. A., Montañez-Soto, J. L., Pimentel - quihua, J. L., Vallejo-Cardona, A. A., López-Calvillo, M. D., y Venegas-González, J. 2017. Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano-industriales de Morelia, Michoacán, México. *RICA.* 33(2), 221-235.
<https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.04>

- Roman, B., y Brennan, R. A. 2019. A beneficial by-product of ecological wastewater treatment: An evaluation of wastewater-grown duckweed as a protein supplement for sustainable agriculture. *Ecol. Eng.* X, 1, 100004.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoena.2019.100004>
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., y Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and 790 semi continuous cultures treating real wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 58–64.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., y Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid- state fermentation. *Process biochemistry*, 40 (8), 2689-2694.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>
- Shanks, O. C., Domingo, J. W. S., Lu, J., Kelty, C. A., y Graham, J. E. 2007. Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2416–2422. DOI:10.1128/AEM.02474-06.
- Sharma, R., y Devi, S. 2018. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Tech.* 17(1), 19-45. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9454-x>
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., y Roessler, P. 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae Golden. Colorado. (NREL/TP-580-24190) National Renewable Energy Laboratory.
- Shuval H., A. Adien, B. Fattal, E. Rawitz y P. Yekutial. 1986. Wastewater irrigation in developing countries. World bank Technical Paper # 51, Washington, D.C. 322 p.
- Simon, C., y Daniel, R. 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4), 1153-1161. DOI:10.1128/AEM.02345-10
- Singh, M., Reynolds, D. L., y Das, K. C. 2011. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Biores. Technol.* 102(23), 10841-10848.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.037>
- Singh, V., Tiwari, A., y Das, M. 2016. Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: a review. *Fuel.* 173, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.01.031>

- Singh A, Sharma N, Farooqi H, Abdin M, Mock T, y Kumar S. 2017. Phycoremediation of municipal wastewater by microalgae to produce biofuel. *Int. J. Phytorem.* 19, 805-812. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1284758>
- Schmitz, O. J., Hawlena, D., y Trussell, G. C. 2010. Predator control of ecosystem nutrient dynamics. *Ecology Let.* 13(10), 1199-1209. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01511.x>
- Streit, W. R., y Schmitz, y R. A. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Curr. Op. Microbiol.* 7(5), 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Su, Y., Mennerich, A., y Urban, B. 2012. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Biores. Technol.* 105, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.113>
- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F. E., Nakamura, S., Hong, P. Y., et al. 2012. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environ. Microbiol.* 14(2), 441-452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>
- Tan, B., Ng, C. M., Nshimiyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y. H., y Thompson, J. R. 2015. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front. Microbiol.* 6, 1027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>
- Tang, X., He, L. Y., Tao, X. Q., Dang, Z., Guo, C. L., Lu, G. N., y Yi, X. Y. 2010. Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil. *J. Hazardous Mat.* 181(1-3), 1158-1162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.033>
- Tarlan, E., Dilek, F.B., y Yetis, U. 2002. Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresourc. Technol.* 84, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00029-9)
- Thompson, A. W., Foster, R. A., Krupke, A., Carter, B. J., Musat, N., et al. 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science.* 337(6101), 1546-1550. DOI:10.1126/science.1222700

- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nüsslein, T. L. Marsh, y S. J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 13, 109–122. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8)
- Ting, H., Haifeng, L., Shanshan, M., Zhang, Y., Zhidan, L., y Na, D. 2017. Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. *Inter. J. Agr. Biol. Eng.* 10(1), 1-29. DOI:10.3965/j.ijabe.20171001.2705
- Troiano, D., Orsat, V., y Dumont, M. J. 2020. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renew. Sust. Energy Rev.* 117, 109472. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109472>
- Tsiplakou, E., Abdullah, M. A. M., Skliros, D., Chatzikonstantinou, M., Flemetakis, E., Labrou, N., y Zervas, G. 2017. The effect of dietary *Chlorella vulgaris* supplementation on micro- organism community, enzyme activities and fatty acid profile in the rumen liquid of goats. *J. Animal Physiol. Animal Nutr.* 101(2), 275-283. <https://doi.org/10.1111/jpn.12521>
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., et al. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the *Sargasso* Sea. *Science*, 304 (5667), 66-74. DOI:10.1126/science.1093857
- von Sperling, M. 2007. Wastewater characteristics, treatment and disposal (Vol. 1). IWA publishing. (pp 28-32). Biological wastewater treatment series, London, UK.
- Walls, L. E., Velasquez-Orta, S. B., Romero-Frasca, E., Leary, P., Noguez, I. Y., y Ledesma, M. T. O. 2019. Non-sterile heterotrophic cultivation of native wastewater yeast and microalgae for integrated municipal wastewater treatment and bioethanol production. *Biochem. Eng. J.* 151,107319. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107319>
- Wan, C., y Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.* 30(6), 1447-1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., y Ruan, R.R., 2010a. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 2623–2628. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., et al. 2010b. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant.

- Appl. Biochem. Biotechnol. 162(4), 1174-1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang, M., Kuo-Dahab W.C., Dolan S., y Park C. 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. Bioresour. Technol. 154, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.047>
- Wang, M., y Park, C. 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. Biomass Bioener. 80, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.028>
- Wang, J., Liu, Q., Wu, B., Zhao, F., Ma, S., et al. 2019. Quorum sensing signaling distribution during the development of full-scale municipal wastewater treatment biofilms. Sci. Total Environ. 685, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.249>
- Ward, D.M., Weller, R., y Bateson, M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature. 345, 63–65. <https://doi.org/10.1038/345063a0>
- Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., et al. 2005. Symbiotic association in *Chlorella* culture. FEMS Microbiol. Ecol. 51(2), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.004>
- Wei, Z., Liu, Y., Feng, K., Li, S., Wang, S., et al. 2018. The divergence between fungal and bacterial communities in seasonal and spatial variations of wastewater treatment plants. Sci. Total Environ. 628, 969–978. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.02.003
- Wexler, M, Bond, P.L., Richardson D. J., y Johnston A. W. B. 2005. A wide host-range metagenomic library from a wastewater treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. Environ. Microbiol. 7(12), 1917–1926. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00854.x>
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, N., D. Gelfand, J. Sninsky & T. White, Eds.), Academic Press. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10003361904/>

- Wild, K. J., Trautmann, A., Katzenmeyer, M., Steingaß, H., Posten, C., y Rodehutschord, M. 2019. Chemical composition and nutritional characteristics for ruminants of the microalgae *Chlorella vulgaris* obtained using different cultivation conditions. *Algal Res.* 38, 101385. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101385>
- Wrede, D., Taha, M., Miranda, A. F., Kadali, K., Stevenson, T., et al. 2014. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS One*, 9(11), e113497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113497>
- Wu, Y. H., Hu, H. Y., Yu, Y., Zhang, T. Y., Zhu, S. F., et al. 2014. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: a review. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 33, 675-688. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.02.026>
- Yang, C., Hua, Q., y Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* 6, 87–102. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)
- Yang, L., Li, H., y Wang, Q. 2019. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. *Biores. Technol.* 275, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.036>
- Yang, Y., Wang, G., Wang, B., Du, L., Jia, X., y Zhao, Y. 2011a. Decolorization of malachite green by a newly isolated *Penicillium* sp. YW 01 and optimization of decolorization parameters. *Environ. Eng. Sci.* 28(8), 555-562. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0172>
- Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Li, Q., Li, B., et al. 2011b. Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 45(17), 7408–7415. DOI:10.1021/es2010545.
- Ye, L., Zhang, T., Wang, T., y Fang, Z. 2012. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environ. Sci. Technol.* 46(24), 13244–13252. DOI:10.1021/es303454k.

- Zaprasis, A., Liu, Y. J., Liu, S. J., Drake H. L., y Horn, M. A. 2010. Abundance of novel and diverse *tfdA*-like genes, encoding putative phenoxyalkanoic acid herbicide-degrading dioxygenases, in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 119–128.
[DOI:10.1128/AEM.01727-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01727-09)
- Zambon, Y., Canel, A., Bertaccini, A., y Contaldo, N. 2018. Molecular diversity of phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in north-eastern Italy. *Phytopathol.* 108(2), 206-214. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0253-R>
- Zhang, H., Feng, J., Chen, S., Li, B., Sekar, R., et al. 2018. Disentangling the drivers of diversity and distribution of fungal community composition in wastewater treatment plants across spatial scales. *Front. Microbiol.* 9, 1291.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01291>
- Zhang, X., Liu, X., Wang, Q., Chen, X., Li, H., Wei, J., y Xu, G. 2014. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triqueter*. *Inter. Biodet. Biodegr.* 87, 99e105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.11.007>
- Zhou, W., Li, Y., Min, M., Hu, B., Chen, P., y Ruan, R. 2011. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Biores. Technol.* 102(13), 6909– 6919.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.038>
- Zhu, L., Wang, Z., Takala, J., Hiltunen, E., Qin, L., Xu, Z., ... y Yuan, Z. 2013. Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. *Biores. Technol.* 137, 318-325.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.144>

Resumen bibliográfico
M.C. Juan Manuel Ballesteros Torres

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: Optimización del proceso secundario para el saneamiento de aguas residuales a nivel de biorreactor con un consorcio microbiano y el uso de biomasa obtenida como suplemento en la alimentación de ganado.

Campo de estudio: Ciencias de la Vida

Datos personales: Nacido en Monclova, Coahuila; el 15 de enero de 1986. Hijo de Juan Manuel Ballesteros Medrano y Ana Bertha Torres Medrano.

Educación: egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL con el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2008.

Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el título de Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología.

Experiencia profesional: Investigador no docente en la Facultad de Ciencias Biológicas (2013); Jefe del laboratorio de Bioprocesos en Vitagénesis (2014-2015); Docente a nivel bachillerato y licenciatura de diversas asignaturas (2010-2013; 2015-2016).

Publicaciones:

- Ballesteros-Torres, J. M., Samaniego-Moreno, L., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R. S., Rodríguez-Padilla, C., & Tamez-Guerra, P. (2019). Amino acids and acylcarnitine production by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* microalgae from wastewater culture. *PeerJ*, 7, e7977.