

**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Título de la Tesis:**

POBLACIÓN MICROBIANA DE UN BIORREACTOR CONTAMINADO  
CON METALES PESADOS MEDIANTE METAGENOMA.

**Nombre del estudiante:**

Claudia Elizabeth Aceves Suriano.

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA.

**Director de la Tesis:**

Dr. Luc Dendooven.

Ciudad de México a martes, 9 de noviembre de 2021.

# Comité tutorial

Director de tesis:

Dr. Luc Dendooven

Asesores:

Dr. Frédéric Thalasso Siret

(CINVESTAV-IPN)

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

(CINVESTAV-IPN)

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

(CICB-Universidad Autónoma de  
Tlaxcala)

## Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por los apoyos durante este periodo.

A mi director de tesis, el Dr. Luc J. Dendooven, por toda la paciencia, los consejos, las asesorías y todas las revisiones de mi tesis y artículo.

A mis asesores de tesis Dra. Yendi E. Navarro Noya, Dr. Frédéric Thalasso y Dr. Rodolfo Marsch Moreno, por las asesorías, comentarios y tutoriales que fueron de gran ayuda para la redacción de esta tesis.

A mi equipo de trabajo. Mario y Steph por ayudarme con los scripts iniciales y toda la ayuda posterior. Nina y Gabriel por la disposición a explicarme los antecedentes del presente trabajo. Vanessa por ayudarme en el mundo de la bioinformática.

A mis compañeras de clase Erika, Karen, Bety, Sara, Jessica y Connie, por la disponibilidad de escucharme en mis muchos ensayos, y los comentarios y observaciones que fueron de mucha ayuda.

A mis amigas Paola y Hatzi, ustedes saben porqué.

Y a mi familia. Especialmente a mis hermanos Omar y Karina y mi cuñada Gaby por todo el apoyo y las porras.

Venus. Siempre te recordaré.

# Contenido

Comité tutorial .....	I
Agradecimientos .....	II
Contenido de figuras .....	V
Contenido de tablas .....	VII
Abreviaturas .....	VIII
1. Resumen.....	1
2. Abstract .....	3
3. Introducción .....	5
3.1 Lodos activados.....	5
3.2 Metales pesados. ....	6
3.3 Caracterización de comunidades bacterianas y eucarióticas .....	9
3.4 Biorreactores .....	10
4. Justificación.....	11
5. Hipótesis.....	12
6. Objetivos .....	13
6.1 Objetivo general .....	13
6.2 Objetivos específicos.....	13
7. Materiales y Métodos.....	14
7.1 Estrategia experimental de biorreactores .....	14
7.2 Demanda química de oxígeno y medición de biomasa .....	17
7.3 Amplificación y secuenciación de amplicones .....	17

7.4	Análisis bioinformático .....	18
7.5	Análisis de datos composicionales .....	18
7.6	Diversidad Alfa .....	19
7.7	Predicción de metagenoma.....	19
8.	Resultados .....	21
8.1	Parámetros químicos .....	21
8.2	Cambios en la composición taxonómica de las comunidades bacterianas .....	23
8.3	Cambios en la composición taxonómica de las comunidades eucarióticas.....	28
8.4	Diversidad Alfa .....	31
8.4.1	Diversidad alfa de las comunidades bacterianas .....	31
8.4.2	Diversidad alfa de las comunidades eucarióticas .....	32
8.5	Predicción funcional de comunidades bacterianas .....	34
8.6	Predicción funcional de comunidades eucarióticas.....	35
9.	Discusión.....	36
9.1	Parámetros químicos .....	36
9.2	Comunidad bacteriana.....	37
9.3	Comunidades eucarióticas.....	40
9.4	Diversidad Alfa .....	41
9.5	Predicción funcional.....	42
10.	Conclusiones .....	43
11.	Recomendaciones.....	44
12.	Bibliografía .....	45

## Contenido de figuras

Fig. 1. Proceso secundario del tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados. ....	6
Fig. 2. Metodología seguida para el presente estudio. ....	14
Fig. 3. Representación de la extracción de muestras. Las líneas negras representan el día final de cada fase y las líneas rojas punteadas representan el día que se tomaron las muestras en cada biorreactor. .	17
Fig. 4. a) Remoción de DQO y b) concentración de biomasa en el biorreactor control (●) y en el biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn (●).....	22
Fig. 5. Frecuencia relativa (%) de filo bacterianos y clases de Proteobacteria en a) la fase de estabilización y en b) cada fase del biorreactor control y c) el biorreactor contaminado con metales pesados y las concentraciones de Ni, Cu y Zn que fueron añadidas a cada fase del biorreactor contaminado. ....	24
Fig. 6. Frecuencia relativa (%) de géneros de bacterias durante a) fase de estabilización, y cada una de las fases del b) biorreactor control y c) biorreactor contaminado con metales pesados. La nomenclatura de las muestras se puede observar en la Fig. 5.....	26
Fig. 7. Análisis de componentes principales a nivel filo de la fase I (periodo de estabilización) en ambos biorreactores (●) y en las fases del biorreactor control (○) y en el biorreactor contaminado con metales pesados (●). <i>Los números indican el día en que fue tomada cada muestra.</i> .....	27
Fig. 8. Análisis de componentes principales a nivel género de la fase I (periodo de estabilización) en ambos biorreactores (●), en el biorreactor control (○) y en el biorreactor contaminado con metales pesados (●). <i>Los números indican el día en que fue tomada cada muestra.</i> .....	28
Fig. 9. Frecuencia relativa (%) de filo en las comunidades eucarióticas del a) biorreactor control y el b) biorreactor contaminado con metales pesados. ....	29
Fig. 10. Frecuencia relativa (%) de géneros de eucariontes del a) biorreactor control y el b) biorreactor contaminado con metales pesados.....	30

Fig. 11. Análisis de componentes principales a nivel a) filo y b) género de las comunidades eucarióticas de ambos biorreactores.....	31
Fig. 12. Números Hill de las comunidades bacterianas en órdenes taxonómicos a) $q=0$ , b) $q=1$ y c) $q=2$ . .....	32
Fig. 13. Números Hill de las comunidades eucarióticas en órdenes de diversidad a) $q=0$ , b) $q=1$ y c) $q=2$ . .....	33
Fig. 14. Predicción funcional del biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado con metales pesados (azul) de las comunidades bacterianas.....	34
Fig. 15. Predicción funcional del biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado con metales pesados (azul) de las comunidades eucarióticas.....	35

## Contenido de tablas

Tabla 1. Condiciones experimentales del biorreactor contaminado. (biorreactor alimentado con flujo continuo de metales pesados).....	15
Tabla 2. Composición del agua residual sintética alimentada a ambos biorreactores.....	16



## Abreviaturas

<b>16S rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal de la subunidad 16S (procariontes)
<b>18S rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal de la subunidad 18S (eucariontes)
<b>ASV</b>	Variante de secuencia de amplicón
<b>CLR</b>	Centered log-ratio
<b>F</b>	Forward
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración media inhibitoria (por sus siglas en inglés)
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés)
<b>PICRUSt2</b>	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States v.2
<b>QIIME2</b>	Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2
<b>v</b>	Versión
<b>VVM</b>	Volumen de gas por volumen del biorreactor.
<b>R</b>	Reverse

# 1. Resumen

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más importantes hoy en día. Metales pesados como Ni, Cu y Zn son a su vez micronutrientes esenciales, pero a alta concentración pueden causar efectos negativos a los organismos. Dos biorreactores continuos fueron inoculados con lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales y operaron durante 141 días divididos en seis fases. Un biorreactor fue contaminado con concentraciones ascendentes conocidas de Ni, Cu y Zn, hasta alcanzar una concentración que causa una inhibición del 50% de la población microbiana ( $IC_{50}$ ); mientras que el segundo biorreactor no fue contaminado y se consideró como biorreactor control. Ambos biorreactores se compararon para investigar el efecto de metales pesados sobre la dinámica de las comunidades microbianas. Se extrajeron muestras en días específicos de cada fase para la medición de biomasa, remoción de demanda química de oxígeno (DQO), extracción de DNA, amplificación y análisis de los genes 16S rRNA para procariontes y 18S rRNA para eucariontes y la predicción de genes funcionales mediante el algoritmo PICRUSt2 usando los datos taxonómicos. Los metales pesados afectaron negativamente la remoción de DQO. Se observó una disminución en la biomasa cuando se añadían metales pesados al inicio de cada fase en el biorreactor contaminado, seguida por una recuperación de la biomasa, excepto en la última fase, lo cual sugiere que la biomasa es capaz de adaptarse a las nuevas condiciones del sistema, excepto a una  $IC_{50}$  del 100%. En general los metales pesados tuvieron un fuerte efecto negativo sobre la diversidad de especies microbianas. El filo bacteriano Bacteroidetes, la clase Gammaproteobacteria y los géneros bacterianos *Stenotrophomonas* y *Sphingobacterium*, así como algas del género *Symbiodinium* resistieron a las concentraciones más altas de metales pesados. La predicción de funcionalidad reveló que las rutas de metabolismo como

metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de carbohidratos fueron las más abundantes y que las rutas de procesamiento de información genética como replicación, traducción y transcripción no fueron inhibidas por los metales pesados.

## 2. Abstract

Nowadays, the pollution caused by heavy metals is one of the most important environment problems in the world. Heavy metals such as Ni, Cu and Zn are essential micronutrients for living organisms in low amounts, but in high concentrations, these heavy metals can cause negatively effects in organisms. In this project, two bioreactors were set up and were inoculated with activated sludge from a wastewater treatment plant, and were operated for 141 days, into six phases. The first bioreactor was polluted with Ni, Cu and Zn at ascending concentrations, until a  $IC_{50}$  at 100%. The polluted bioreactor was considered as heavy metal-amended bioreactor. The second bioreactor was not polluted which was considered as unamended bioreactor. Both bioreactors, the heavy metal-amended and unamended bioreactor were compared for studying the effect of the heavy metals in the dynamics of microbial communities. Samples was extracted in specific days within the studio, for biomass measurement, chemical oxygen demand (COD) removal, DNA extraction for amplifying and analyzing the 16S rRNA gene for prokaryotic groups and 18S rRNA gene for eukaryotic groups and the prediction of functional genes in the software PICRUSt2 using the taxonomic data. The COD removal was negatively affected by the heavy metals. When heavy metals were added in the heavy metal-amended bioreactor, a decreasing followed by an increasing concentration in the biomass was observed until phase V, which suggest that the biomass is capable to adapting to the new system conditions, except in an  $IC_{50}$  at 100%. In general, the heavy metals impacted negatively in the microbial species diversity. The phylum Bacteroidetes, the class Gammaproteobacteria and the bacterial genus *Stenotrophomonas* and *Sphingobacterium* and the algal genus *Symbiodinium* resisted the high concentrations of heavy metals in the metal-amended bioreactor. The functional prediction indicated that the pathways centered in intermediary metabolism such as

metabolism of cofactors and vitamins, metabolism of amino acids and carbohydrate metabolism were the most abundant pathways in all the functions, and the genetic information processing such as replication and repair, transcription and translation were not inhibited by heavy metals added to the heavy metal-amended bioreactor.

### **3. Introducción**

#### *3.1 Lodos activados*

El tren de tratamiento de aguas residuales se conforma principalmente por el tratamiento primario, secundario y terciario. El objetivo del tratamiento primario es eliminar los sólidos en suspensión presentes en el agua residual y en el tratamiento secundario se busca eliminar la materia orgánica mediante la utilización de microorganismos. Uno de los sistemas más usados en el tratamiento secundario es el sistema de lodos activados. En este sistema el agua residual ingresa a un tanque, generalmente aerobio (por sistemas de aireación), el cual contiene, mayoritariamente, microorganismos heterótrofos facultativos en suspensión. Los microorganismos consumen la materia orgánica disponible del agua residual y el oxígeno disuelto, generando CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y nuevas células de microorganismos (biomasa) como producto. Al agua que está siendo tratada y que contiene los microorganismos en suspensión es llamada licor mixto. Posteriormente, el licor mixto es introducido al tanque de sedimentación, en el cual los microorganismos son separados del agua residual tratada mediante sedimentación gravitatoria. El agua tratada continúa su curso al tratamiento terciario. La biomasa sedimentada es llamada lodos activados por la presencia de microorganismos activos. Una parte de la biomasa y partículas suspendidas, es recirculada al tanque de aireación para mantener la población necesaria para el proceso de tratamiento biológico y el exceso de lodo activado es llevado a disposición final (Metcalf y Eddy, 1991; Fig. 1).

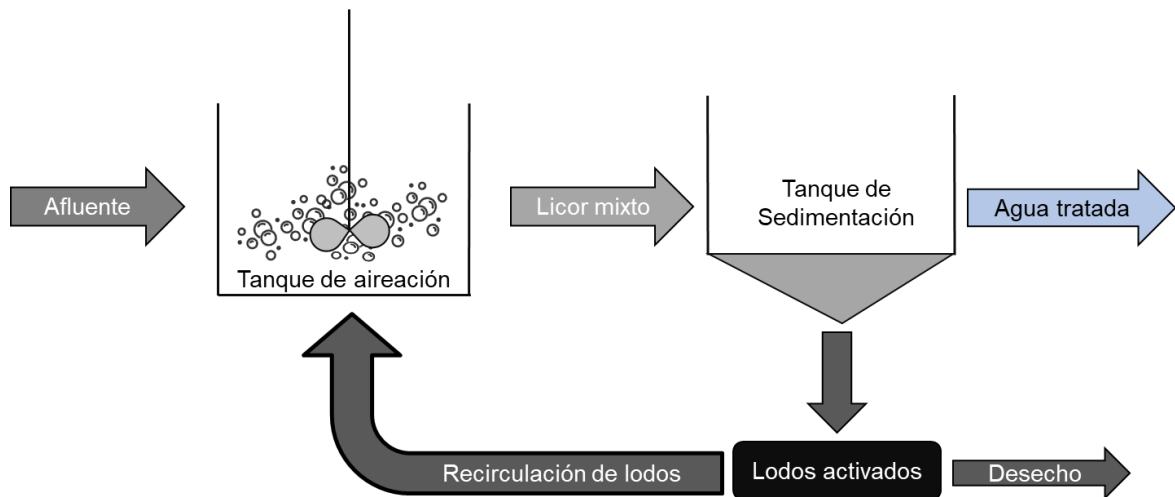


Fig. 1. Proceso secundario del tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados.

### 3.2 Metales pesados.

Los metales pesados son elementos que se caracterizan por tener una densidad cinco veces mayor a la del agua y tener un número atómico mayor a 20 (Saxena *et al.*, 2020). Son trece los metales y metaloides considerados como contaminantes, entre ellos se destacan al cobre (Cu); níquel (Ni); y zinc (Zn) (Sparks, 2005), los cuales forman parte de los metales pesados más usados en la actualidad. Estos metales pesados se pueden encontrar en la naturaleza, principalmente, en rocas ígneas, a concentraciones: Cu a 14-59 mg L<sup>-1</sup>, el Ni entre 5-55 mg L<sup>-1</sup> y Zn entre 40-100 mg L<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias, 2011). Mientras que las principales fuentes antropogénicas de estos elementos son la refinería, metalurgia, manufactura química, la industria de la pintura, baterías, equipos electrónicos, entre otros (Ameh & Sayes, 2019; Denkhau & Salnikow, 2002). Sin embargo, debido a los efectos adversos que ocasionan los metales pesados a altas concentraciones a la salud humana y a los ecosistemas, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (USEPA por sus siglas en inglés) ha

establecido límites máximos permisibles para descargas de aguas residuales ( $\text{mg L}^{-1}$ ): Cu, 0.25; Ni, 0.20; y Zn 0.80 (Gunatilake, 2015).

Los metales pesados como Cu y Zn en concentraciones limitadas son necesarias para el mantenimiento del metabolismo biológico. Las concentraciones bajas de Zn pueden estimular la actividad biológica pues sirve como cofactor de la RNA polimerasa la cual juega un papel importante en el proceso de transcripción (Bhat *et al.*, 2020). Sin embargo, los metales pesados a concentraciones altas pueden producir un efecto adverso para la salud de los organismos debido a su naturaleza no biodegradable, como afectaciones negativas al sistema nervioso central, sistema metabólico y causa estrés oxidativo (Fu y Xi, 2020). La descarga de metales pesados en los ecosistemas causa riesgo ambiental y contaminación.

La contaminación causada por metales pesados se debe a que los iones pueden acumularse en todos los niveles de la cadena alimenticia mediante la biomagnificación (Wadhawan *et al.*, 2019) y conduce a la hiperacumulación de compuestos tóxicos en los ecosistemas naturales (Mahapatra *et al.*, 2020). Los metales pesados a altas concentraciones son tóxicos para las comunidades microbianas (Bhat *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2009; Kieu *et al.*, 2011) pues inhiben la actividad enzimática y proteica o incluso cambian la estructura de las proteínas lo cual causa una alteración metabólica. Así, a nivel ecosistémico pueden alterar los ciclos biogeoquímicos, por ejemplo el ciclo del nitrógeno ( Li *et al.*, 2019). Cabrera *et al.* (2006) reportaron que el Ni a una concentración mayor a  $8.5 \text{ mg L}^{-1}$  causa un efecto inhibitorio en cultivos de *Desulfovibrio vulgaris*. Su *et al.* (2020) reportaron que las comunidades bacterianas pueden ser impactadas negativamente por presencia de Ni a una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en un biorreactor. Además, son pocos los microorganismos que pueden sobrevivir en presencia de altas concentraciones de ciertos metales pesados (Zhang *et al.*, 2020) activando genes de



resistencia a metales pesados. Por ejemplo, se ha reportado que cuando los metales pesados se encuentran en el ambiente, inducen la sobreexpresión de genes de resistencia a metales pesados en los microorganismos, por ejemplo, *czcR* es la proteína que induce la expresión de *czcC*, *czcB* y *czcA* para la resistencia a Zn, Cd y Co (Dieppo *et al.*, 2012), genes que confieren resistencia a Cu, como *tcrB* (Hasman y Aarestrup, 2002) y *pcoA* (Yin *et al.*, 2017) y genes de resistencia a Ni y Co como *nccA* (Jang *et al.*, 2018).

Uno de los índices que se utiliza actualmente para medir la inhibición es el IC<sub>50</sub>, que se refiere a la concentración de cierto contaminante para inhibir el 50% de la comunidad microbiana. Se ha reportado que una concentración de 40 mg Ni L<sup>-1</sup> causa una inhibición completa de la biomasa en un biorreactor continuo durante un periodo de 4 horas (Hernandez-Martinez *et al.*, 2018) y a una concentración de 33 mg Ni L<sup>-1</sup> el consumo acumulado de oxígeno es cada vez más lento conforme pasa el tiempo, a diferencia de un biorreactor control (sin adición de Ni), y después de 3 horas, la utilización acumulada de oxígeno se inhibe en un 43% (Cokgor *et al.*, 2007). Esquivel-Rios *et al.* (2014) evaluaron la disponibilidad de oxígeno disuelto en biorreactores que contenían concentraciones de 4, 8 y 24 mg Cu (II) L<sup>-1</sup> y 20, 60 y 80 mg Zn (II) L<sup>-1</sup> en un tiempo de exposición de 2 horas, y encontraron que el oxígeno disuelto disponible es proporcional a la concentración evaluada con respecto al tiempo de exposición. También se encontró que un pH neutro asegura la resistencia microbiana en un ambiente contaminado con Cu (II) y Zn (II). Es decir, qué a mayor concentración de metal pesado añadido al sistema, fue mayor la inhibición de la biomasa conforme pasa el tiempo de exposición.

### 3.3 Caracterización de comunidades bacterianas y eucarióticas

La secuenciación de marcadores moleculares es una de las herramientas de análisis más importantes para la investigación en ecología microbiana. Uno de ellos es el gen 16S rRNA (“S” se refiere al coeficiente de sedimentación, y rRNA es el ácido ribonucleico ribosomal), el cual es el marcador genético más usado debido a que está presente en todos los organismos procariontes y posee regiones conservadas. El gen 16S rRNA está compuesto por nueve regiones variables (V), las cuales se enumeran de V1-V9 (Zhang *et al.*, 2018). Las regiones V3-V4 son las regiones más utilizadas para la amplificación del gen 16S rRNA debido a que poseen mayor precisión de asignación taxonómica y poder discriminativo (García-López *et al.*, 2020). La extensión de las regiones V3-V4 es de aproximadamente 460 pares de bases (García-López *et al.*, 2020).

Por otro lado, el gen 18S rRNA es el marcador utilizado para caracterizar las comunidades eucarióticas y es la contraparte eucariótica del 16S rRNA. Al igual que el 16S rRNA, el 18S rRNA posee nueve regiones, de V1-V5 y V7-V9. La región V6 no es recomendable ya que es la región más conservada en eucariontes (Hadziavdic *et al.*, 2014). Las regiones V4-V5 son las regiones más utilizadas debido a su alto nivel discriminatorio (Banos *et al.*, 2018; Hadziavdic *et al.*, 2014), con una extensión total de 422 pb (Borneman & Hartin, 2000). Se ha reportado que a diferencia de otras regiones, la región V4-V5 ha mostrado mayor resolución en la clasificación de eucariontes (Popovic *et al.*, 2018).

### 3.4 Biorreactores

Hoy en día, para llevar a cabo reacciones por microorganismos o sustancias químicamente activas, se utilizan biorreactores, los cuales ofrecen la ventaja de controlar las condiciones de operación como pH, temperatura y producción entre otras variables.

Un biorreactor de lodos activados contiene la comunidad microbiana de las aguas residuales en tratamiento, la cual posee materiales orgánicos e inorgánicos, así como contaminantes a diferentes concentraciones. Ya se han reportado estudios sobre comunidades bacterianas en biorreactores contaminados con metales pesados utilizando como biomasa los lodos activados de aguas residuales municipales (Bhat *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2016), de la industria cervecera (Parades-Aguilar *et al.*, 2021) y sitio de disposición de residuos (Fulekar *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no se ha reportado aún la dinámica de una comunidad microbiana de lodo activado cuando se añaden cada vez más la concentración de metales pesados al sistema.

Muchos microorganismos son seleccionados negativamente por las presiones de selección que ocurren en el sistema donde habitan, mientras que otros son capaces de adaptarse a las nuevas condiciones. Es por ello que en este trabajo se estudiaron a las comunidades microbianas presentes en un biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn a diferentes concentraciones, con el fin de conocer los cambios en la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas y eucarióticas con respecto a un biorreactor no contaminado, siguiendo las mismas condiciones de operación.

## 4. Justificación

La población mundial aumenta exponencialmente. Este crecimiento poblacional demanda, a su vez, productos industriales para los cuales son necesarios el uso de recursos naturales y minerales. La mayoría de las industrias generan desechos que pueden estar contaminados con metales pesados como resultado de los procesos de producción y que son liberados al medio ambiente, ocasionando diversos efectos adversos en los ecosistemas. Las aguas residuales son otro problema de la urbanización apresurada. Para su tratamiento, existen plantas de tratamiento de aguas residuales, cuyo tratamiento secundario utiliza lodos activados en su mayoría. La efectividad del tratamiento del agua residual mediante lodos activados depende de la composición de las comunidades microbianas. Si la composición de dichas comunidades es afectada por la toxicidad de los metales pesados, entonces la efectividad del tratamiento del agua residual disminuye. Se ha reportado que los metales pesados ocasionan daños a los organismos. Sin embargo, aún no se ha reportado el efecto de metales pesados, como Ni, Cu y Zn a concentraciones ascendentes, sobre las comunidades microbianas en el funcionamiento de un biorreactor.

## 5. Hipótesis

La diversidad y estructura de comunidades microbianas serán afectadas negativamente por la adición continua y ascendente de metales pesados como el Ni, Cu y Zn en el biorreactor.

## 6. Objetivos

### *6.1 Objetivo general*

Investigar la dinámica de las comunidades microbianas en un biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn a diferentes concentraciones, usando como biomasa inicial lodos activados de tratamiento de aguas residuales.

### *6.2 Objetivos específicos*

- Determinar el efecto de la mezcla de Ni, Cu y Zn a diferentes concentraciones sobre la frecuencia relativa y diversidad alfa de las comunidades bacterianas y eucarióticas en un biorreactor, en comparación con un biorreactor no contaminado.
- Determinar el efecto de la mezcla de Ni, Cu y Zn a diferentes concentraciones sobre las funciones potenciales del metagenoma en un biorreactor, en comparación con un biorreactor no contaminado.

## 7. Materiales y Métodos

El flujo general de trabajo se ilustra en la Fig. 2.

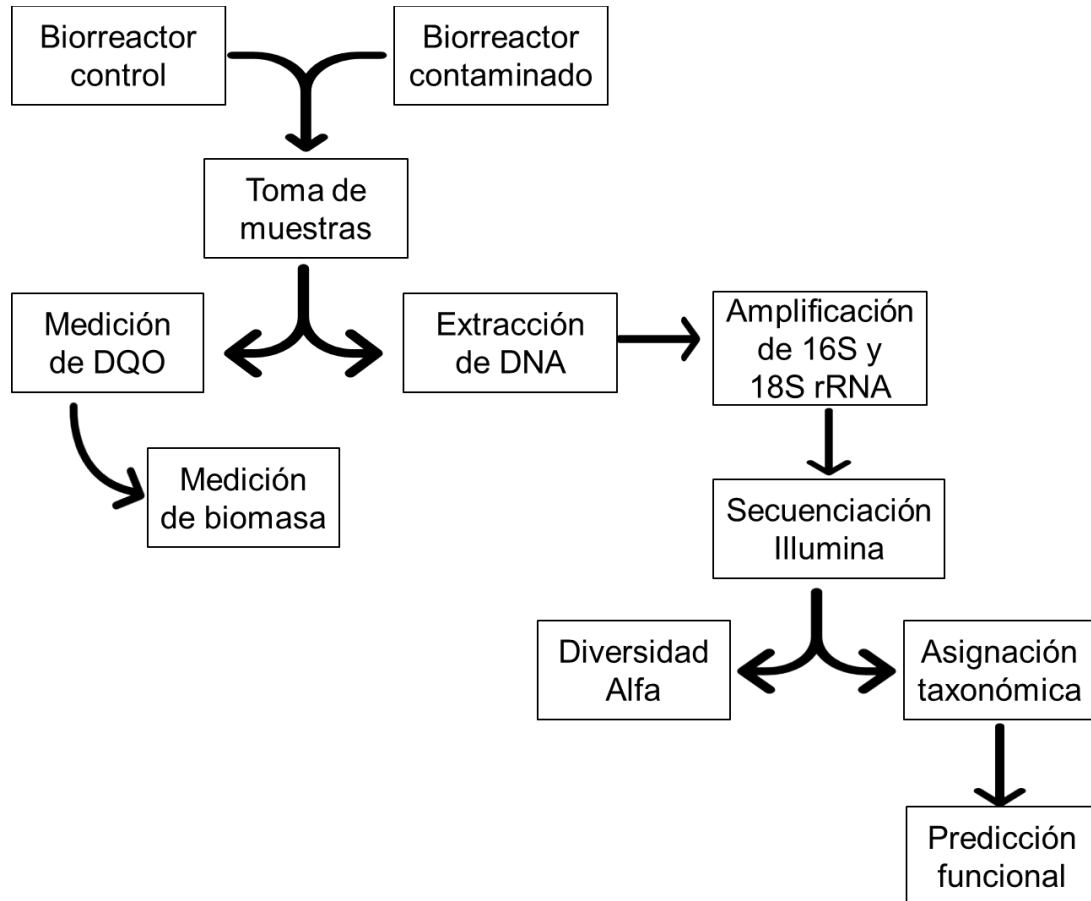


Fig. 2. Metodología seguida para el presente estudio.

### 7.1 Estrategia experimental de biorreactores

Para el presente estudio se pusieron en marcha dos reactores biológicos, uno control y uno problema que fue adicionado con metales pesados, anteriormente descritos por Esquivel-Rios *et al.* (2014). El biorreactor control se enriqueció con 1 L de lodos activados de aguas residuales

de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales ubicada en Ticomán, Ciudad de México, México. El biorreactor problema, considerado a partir de ahora como biorreactor contaminado, se inoculó con 1 L de la biomasa obtenido del biorreactor control. Además, se adicionaron concentraciones conocidas de Cu (II), Ni (II) y Zn (II), en forma  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , en agua desionizada, en seis fases de tiempo, desde el día 0 al día 141. La concentración aumentaba en cada fase, como se muestra en la Tabla 1. Ambos biorreactores operaron continuamente a un volumen de 2.6 L, tiempo de retención hidráulica de 48 horas, a  $\text{pH } 7 \pm 0.5$  mediante adición de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 1 M, a temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , y fueron aireados mediante un difusor poroso a una velocidad constante de 1 VVM (volumen de aire por volumen de licor mixto por minuto), además se les adicionó agua residual sintética, cuyos componentes se muestran en la Tabla 2 (Esquivel-Rios *et al.*, 2014).

Tabla 1. Condiciones experimentales del biorreactor contaminado. (biorreactor alimentado con flujo continuo de metales pesados).

Fase	Tiempo de operación (d)	IC <sub>50</sub>	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		
		(%)	Ni (II)	Cu (II)	Zn (II)
<b>I</b>	0-22	0	0	0	0
<b>II</b>	23-30	5	1.65	0.5	2.0
<b>III</b>	31-38	10	3.30	1.0	4.0
<b>IV</b>	39-63	20	6.60	2.0	8.0
<b>V</b>	64-108	40	13.20	4.0	16.0
<b>VI</b>	109-141	100	33.00	10.0	40.0



IC<sub>50</sub> (Half maximal inhibition concentration) donde 0% representa a la concentración inhibitoria nula y 100% representa la máxima concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) anteriormente reportada por Esquivel-Ríos, *et al.* (2014) y Cokgor *et al.* (2007).

Tabla 2. Composición del agua residual sintética alimentada a ambos biorreactores.

Componente	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
Peptona	160
Extracto de carne	110
Urea	30
NaCl	7
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	4
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.75
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.40
NH <sub>4</sub> Cl	1.70

Se tomó una muestra por triplicado en ambos biorreactores en días específicos (Fig. 3), la cual se guardó en un tubo estéril de 15 mL y se mantuvo a -20°C hasta la extracción de DNA. Para la extracción de DNA se utilizó el método de lisis enzimática desarrollado por Sambrook y Russel (2001) y lisis de choque térmico Valenzuela-Encinas *et al.* (2008).

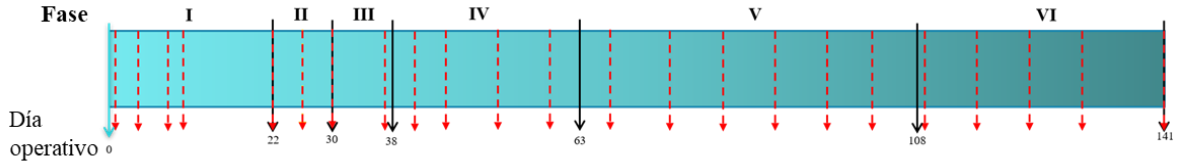


Fig. 3. Representación de la extracción de muestras. Las líneas negras representan el día final de cada fase y las líneas rojas punteadas representan el día que se tomaron las muestras en cada biorreactor.

### 7.2 Demanda química de oxígeno y medición de biomasa

La demanda química de oxígeno (DQO) total se determinó mediante el método colorimétrico establecido (APHA, 1999). La DQO soluble se determinó mediante centrifugación de una muestra a 500 g durante 15 min (Centrifuga 5810R, Eppendorf) y posteriormente se filtró en un tamiz de 0.45  $\mu\text{m}$ . La DQO insoluble ( $\text{DQO}_{\text{total}} - \text{DQO}_{\text{soluble}}$ ) se consideró como biomasa (Contreras *et al.*, 2002) en cada una de las muestras, debido a que el cultivo de entrada no contenía sólidos suspendidos.

### 7.3 Amplificación y secuenciación de amplicones

Para conocer la composición de las comunidades bacterianas se amplificaron los primers universales de las regiones V3-V4, 341F (5'– CCTACGGGIGGCWGCAG – 3') y 805R (5'– GACTACHVGGGTATCTAATCC – 3') (Herlemann *et al.*, 2011) del gen 16S rRNA de bacterias y para conocer las comunidades eucariontes, se amplificaron las regiones V4-V5,

817F (5'-TTAGCATGGAATAATRAATAGGA-3') y 1196R (5'-ATCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3') (Borneman & Hartin, 2000) del gen 18S rRNA.

Los amplicones se purificaron con DNA clean kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) y se cuantificaron usando PicoGreen dsDNA Assay Kit (InvitroGen, Carlsbad, USA) con NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La librería de amplicones fue secuenciada por Macrogen Inc.<sup>®</sup>, (DNA Sequencing Service, Seoul, Korea) con MiSeq 2x300 PE (Illumina, San Diego, California, USA).

#### 7.4 Análisis bioinformático

El análisis de secuencias se realizó utilizando el software *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME2) v. 2020.8 (Bolyen *et al.*, 2019) y sus plugins. El emparejamiento de las secuencias extremas y la demultiplexación de las muestras se realizó dentro de QIIME2. La eliminación de ruido (*denoising*) y calidad de las secuencias se realizaron con DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), eliminando las secuencias con calidad Phred <30. La taxonomía de las secuencias fue obtenida usando la base de datos de Greengenes para las secuencias del gen 16S rRNA y Silva v. 132 para las secuencias del gen 18S rRNA, en las cuales se obtuvieron las frecuencias relativas de ambos biorreactores.

#### 7.5 Análisis de datos composicionales

Todos los datos fueron procesados en el software RStudio v. 4.0.5 (R Core Team). Los datos fueron analizados de acuerdo con lo propuesto por Gloor *et al.* (2017). La normalización

de datos se realizó mediante la transformación centered log-ratio (CLR) de ALDEx2 (Gloor *et al.*, 2021). Se realizó ordenación de datos utilizando Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) usando el paquete FactoMineR (Husson *et al.*, 2020) y gráficos en barras usando ggplot2 (Wickham *et al.*, 2021) para facilitar la exploración de los análisis de datos de las comunidades bacterianas y eucarióticas de cada biorreactor.

### *7.6 Diversidad Alfa*

La diversidad alfa taxonómica fue calculada mediante los números Hill (Chao *et al.*, 2014) utilizando el paquete HillR (Li, 2018) en RStudio v.4.0.5. ingresando la tabla de conteos de cada uno de los biorreactores, a nivel  $q=0$  para todas las ASVs,  $q=1$  para las frecuentes y  $q=2$  para las dominantes. Los resultados obtenidos fueron graficados con el programa ggplot2 dentro de Rstudio.

### *7.7 Predicción de metagenoma*

La predicción del metagenoma se obtuvo utilizando el software Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2) (Douglas *et al.*, 2020) a partir de los datos obtenidos de la secuenciación de las muestras de 16S rRNA y 18S rRNA como un marcador para la asignación de funciones de la comunidad microbiana, dentro del ambiente de QIIME2. Las tablas de conteo y las secuencias representativas resultado de los análisis taxonómicos fueron utilizadas como datos de entrada en el plugin PICRUSt2 en QIIME2. La base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) fue utilizada

para identificar los genes ortólogos. Los resultados fueron normalizados con el programa ALDEx2 en la paquetería de RStudio. Posteriormente, el metabolismo y funcionamiento fueron mapeados con la base de datos de rutas metabólicas de KEGG. Las rutas metabólicas fueron exploradas en el software *Statistical analysis of taxonomic and functional profiles* (STAMP) v. 2.1.3. (Parks *et al.*, 2014).

## 8. Resultados

### 8.1 Parámetros químicos

El experimento se dividió en seis fases con una duración de 141 días en total. Durante la fase I (días 0-22), considerada como la fase de estabilización, la remoción de DQO tuvo un promedio de 87%. Al inicio de la fase II, la remoción de DQO disminuyó en el biorreactor contaminado con metales pesados en comparación del biorreactor no contaminado (considerado como biorreactor control) y disminuyó de nuevo hasta el día 37, en la fase III. El patrón del porcentaje de remoción de DQO fue similar en todas las fases en el biorreactor contaminado. En los primeros días de cada fase se observó una disminución seguida de un aumento del porcentaje de remoción de DQO. Por ejemplo, en el biorreactor contaminado, al inicio de la fase IV (día 41) la remoción de DQO fue de 62% e incrementó a 76% al final de la fase (día 59) y disminuyó en la fase V en el día 67 a 63.8%, este patrón continuó hasta el día 141 (fase VI) cuando se registró el más bajo porcentaje de remoción de DQO en este experimento (48.8%) (Fig. 4a).

La concentración de la biomasa en la fase I para ambos biorreactores mostró un promedio de 556 mg DQO L<sup>-1</sup>. En la fase III del biorreactor control el promedio de la concentración de biomasa fue de 510 mg DQO L<sup>-1</sup> y en el reactor contaminado fue de 478 mg DQO L<sup>-1</sup>. En la fase IV, el promedio de la concentración de biomasa en el biorreactor contaminado disminuyó a 457 mg DQO L<sup>-1</sup> y aumentó a 535 mg DQO L<sup>-1</sup> en la fase V e incrementaba gradualmente. En la fase VI, el promedio en la concentración de biomasa aumentó a 935 mg DQO L<sup>-1</sup>, sin

embargo, en el día 116 la biomasa en el biorreactor contaminado fue de 1156.1 mg DQO L<sup>-1</sup> y después disminuyó de nuevo en el día 141 a 604 mg DQO L<sup>-1</sup> (Fig. 4b).

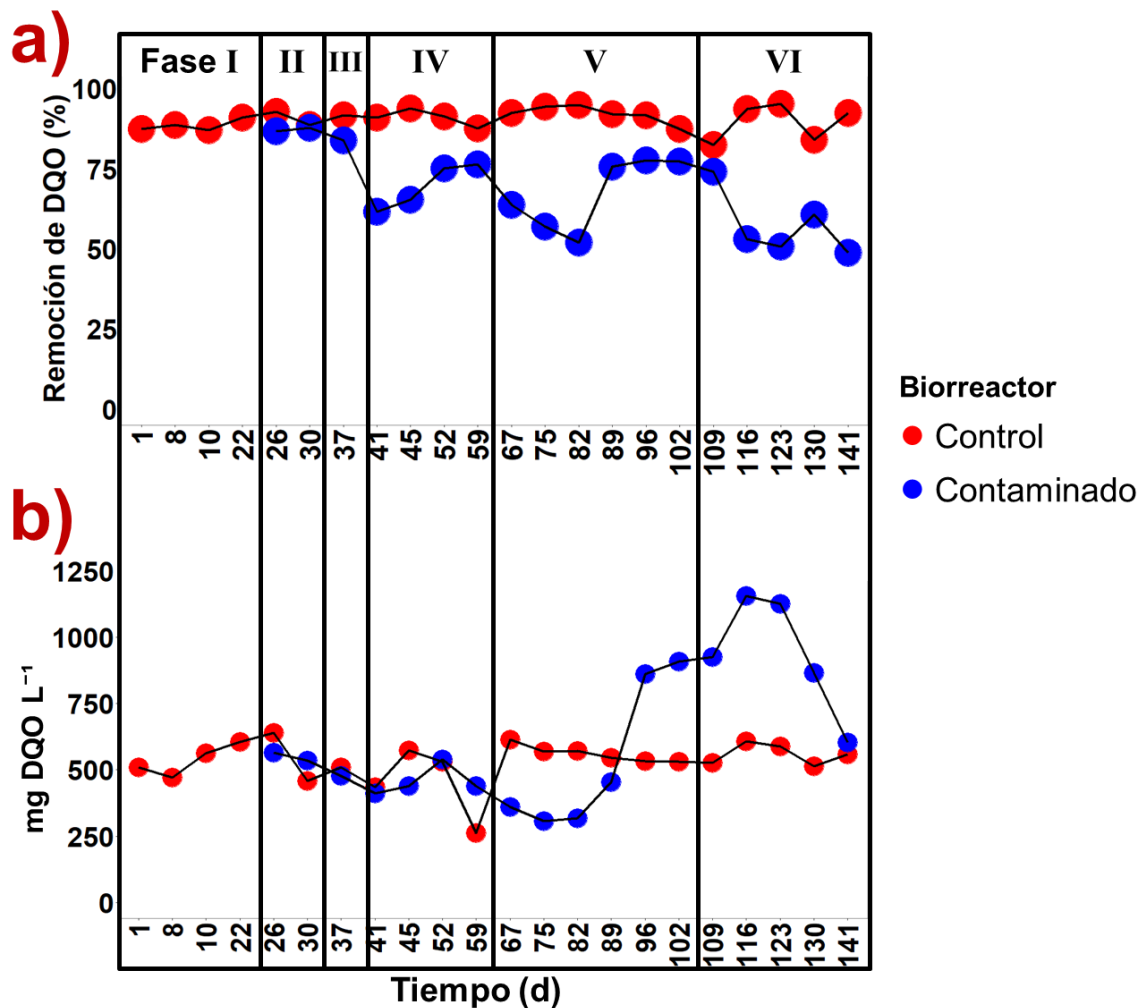


Fig. 4. a) Remoción de DQO y b) concentración de biomasa en el biorreactor control (●) y en el biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn (●)

## 8.2 Cambios en la composición taxonómica de las comunidades bacterianas

En la fase I, denominada fase de estabilización, la comunidad bacteriana fue dominada por el filo Proteobacteria (frecuencia relativa de 76%) y el género *Lacihabitans* con un 19% de la comunidad total (Fig. 5a).

En el biorreactor control, las frecuencias relativas de los filos bacterianos fueron constantes, es decir, no se observaron cambios evidentes a través del tiempo (Fig. 5b). Mientras que la frecuencia relativa de la mayoría de los grupos bacterianos mostró cambios evidentes a través del tiempo en el biorreactor contaminado con metales pesados, en el cual la comunidad bacteriana fue dominada por Alphaproteobacteria con una frecuencia relativa de 79% en la fase II y 75% en la fase III (Fig. 5c). La frecuencia relativa del género *Agrobacterium* fue del 32% en la fase II e incrementó a 48% en la fase III, pero disminuyó a 21% en la fase IV en el biorreactor contaminado (Fig. 6c). En el biorreactor control, en las fases II, III, IV y parte de la fase V, el género *Leadbeterella* mostró una frecuencia relativa superior al resto de los géneros (Fig. 6b). Se puede observar que, al inicio de cada fase, este grupo mostró una frecuencia relativa alta y conforme pasan los días esta disminuye hasta el final de la fase. *Shinella* es un género que estuvo presente en el biorreactor control, en alta frecuencia relativa en la fase IV y en menor frecuencia en las fases posteriores, a diferencia del biorreactor contaminado, donde no se observó en altas frecuencias relativas.



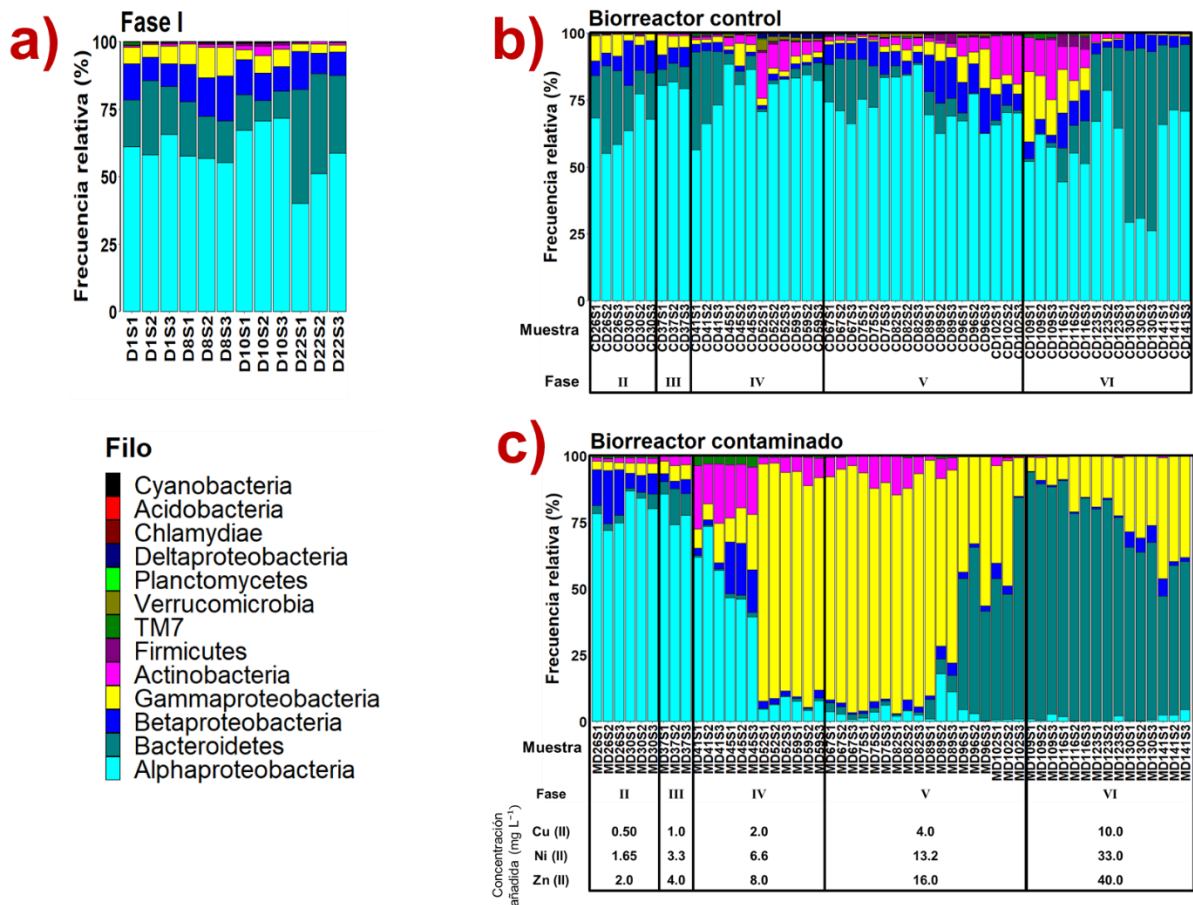


Fig. 5. Frecuencia relativa (%) de fila bacterianos y clases de Proteobacteria en a) la fase de estabilización y en b) cada fase del biorreactor control y c) el biorreactor contaminado con metales pesados y las concentraciones de Ni, Cu y Zn que fueron añadidas a cada fase del biorreactor contaminado.

La nomenclatura de las muestras inicia con el biorreactor al que corresponde cada muestra; C= Control y M = Biorreactor contaminado con metales pesados, el día en el que fue tomada cada muestra (D) y el número de muestra (S).

En las fases IV y V del reactor contaminado, la comunidad bacteriana fue dominada por Gammaproteobacteria con una frecuencia relativa de 55% en la fase IV e incrementó a 70% en

la fase V. Los miembros del género *Stenotrophomonas* dominaron en la fase IV con un promedio en la frecuencia relativa de 47% e incrementó a 59% en la fase V.

En la fase VI, el filo más abundante fue Bacteroidetes, con una frecuencia relativa de 74% y *Sphingobacterium* el género más abundante (frecuencia relativa de 23%). El segundo género más abundante en el biorreactor contaminado fue *Stenotrophomonas* (16%). En el biorreactor contaminado, los géneros *Sphingobacterium* (frecuencia relativa promedio de 70%) y *Stenotrophomonas* (frecuencia relativa promedio de 23%) fueron los más abundantes, mientras que en el biorreactor control, los grupos bacterianos fueron más diversos. Al final de la fase VI (días 123-141) los géneros más abundantes fueron *Azospirillum* con una frecuencia relativa promedio de 20%, *Brevundimonas* 44% y *Sphingobacterium* con frecuencia relativa promedio de 24% en el biorreactor control. Durante esos días, *Sphingobacterium* fue el único género encontrado en ambos biorreactores.

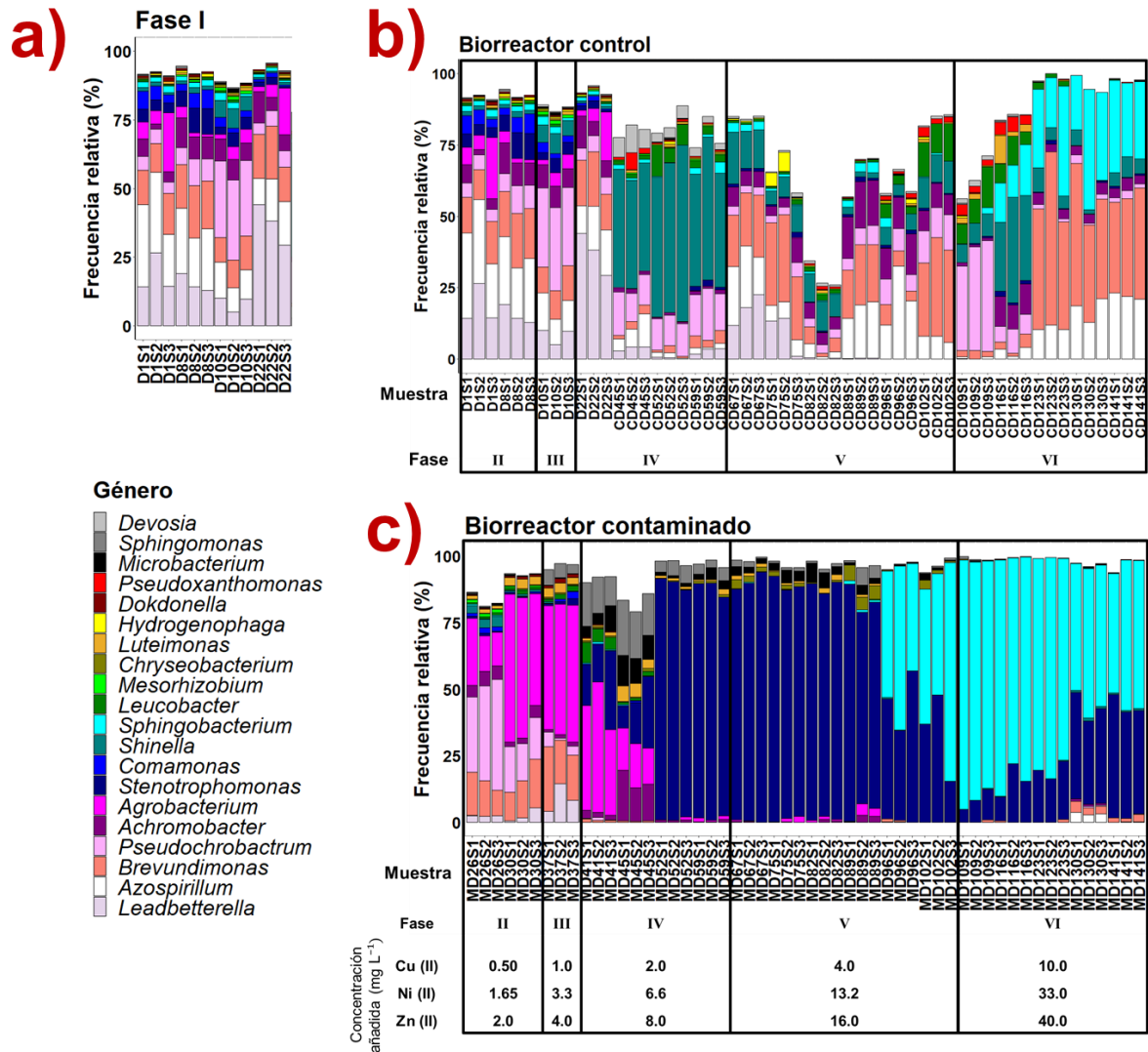


Fig. 6. Frecuencia relativa (%) de géneros de bacterias durante a) fase de estabilización, y cada una de las fases del b) biorreactor control y c) biorreactor contaminado con metales pesados. La nomenclatura de las muestras se puede observar en la Fig. 5.

Los PCA considerando todos los filos y clases de Proteobacteria (Fig. 7) y los grupos bacterianos asignados a un nivel taxonómico de género (Fig. 8), mostraron que la comunidad bacteriana en el biorreactor control fue claramente diferente a la del biorreactor contaminado

en las fases IV, V y VI, mostrándose agrupación de los dos biorreactores. En la fase V se muestra una evidente agrupación en el día 96 y 102 (líneas punteadas). Además, los géneros *Stenotrophomonas* y *Agrobacterium* fueron favorecidos en el biorreactor contaminado con metales pesados en la fase III, IV, V y VI, a diferencia del biorreactor control.

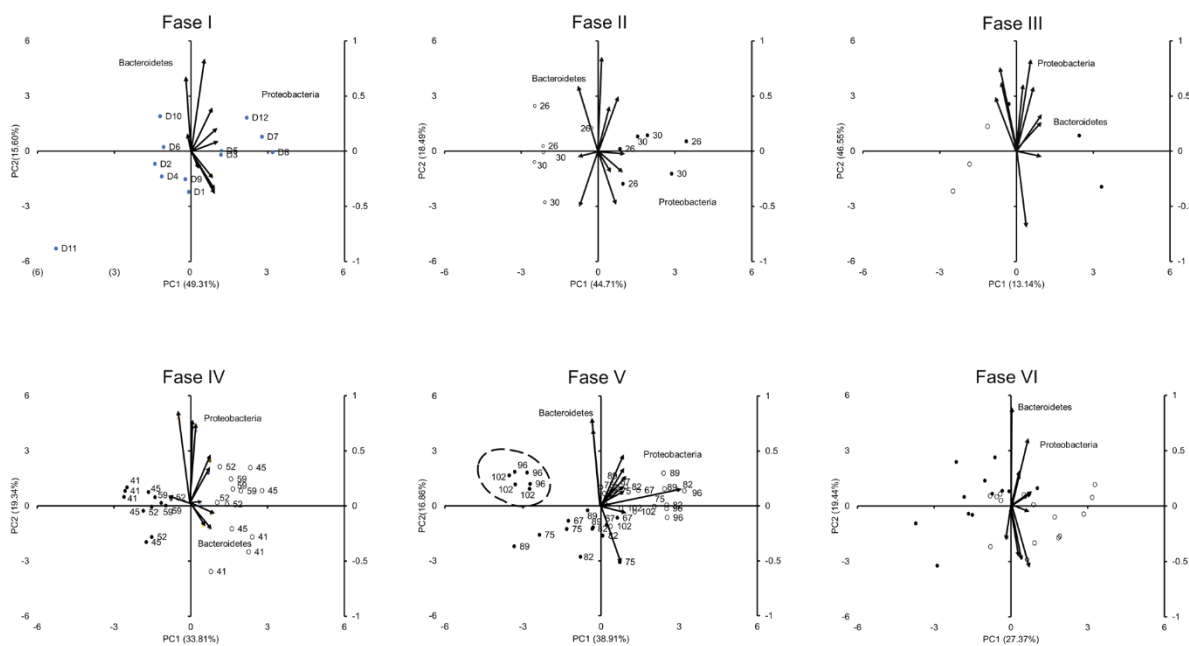


Fig. 7. Análisis de componentes principales a nivel filo de la fase I (periodo de estabilización) en ambos biorreactores (●) y en las fases del biorreactor control (○) y en el biorreactor contaminado con metales pesados (●). Los números indican el día en que fue tomada cada muestra.

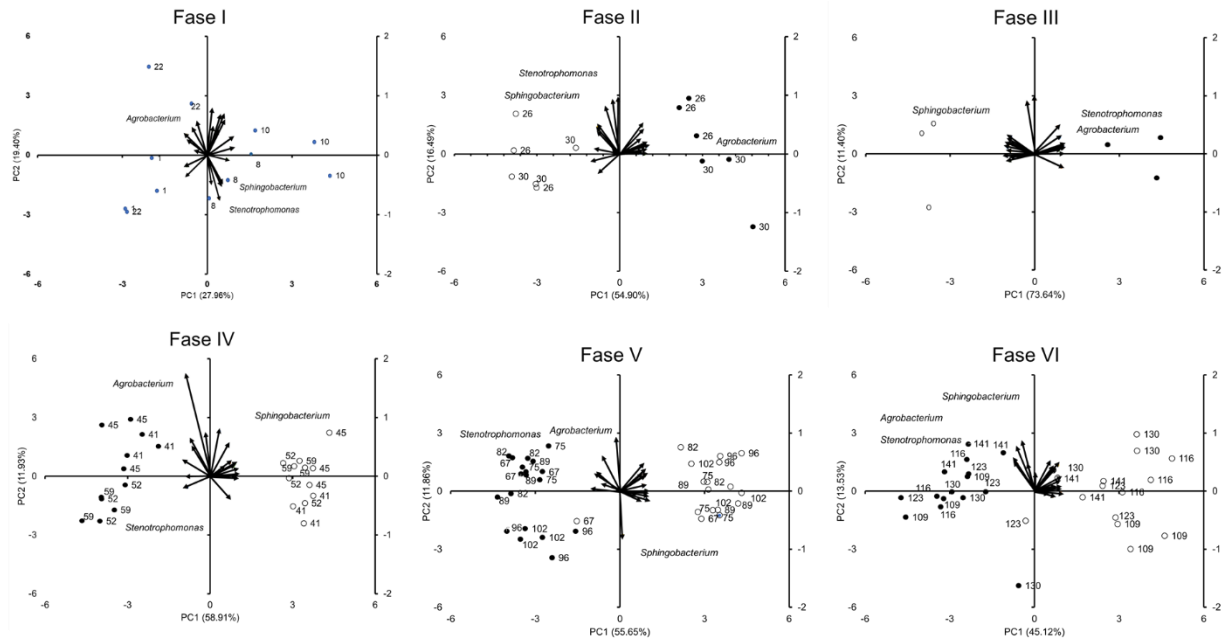


Fig. 8. Análisis de componentes principales a nivel género de la fase I (periodo de estabilización) en ambos biorreactores (●), en el biorreactor control (○) y en el biorreactor contaminado con metales pesados (●). Los números indican el día en que fue tomada cada muestra.

### 8.3 Cambios en la composición taxonómica de las comunidades eucarióticas

El filo Dinoflagellata fue el más abundante en todas las fases y tratamientos, seguido por el filo Basidiomycota. El género más abundante fue *Symbiodinium* (Dinoflagellata). Durante la fase de estabilización, la frecuencia relativa de Dinoflagellata fue de 46% y Basidiomycota de 9%. Sin embargo, en el biorreactor contaminado, la frecuencia relativa de Dinoflagellata disminuyó a 9% en la fase II y después a 0.64% en la fase III (Fig. 9a) a diferencia del biorreactor control donde aumentó a 67% en la fase II y después a 88% en la fase III (Fig. 9b).

Durante la fase IV el filo Basidiomycota aumentó su frecuencia relativa en el biorreactor control a 69% mientras que Dinoflagellata aumentó a 38% en el biorreactor contaminado. Después, disminuyó a 13% en la fase V y a 7% en la última fase, contrario al biorreactor control donde Dinoflagellata aumentó la frecuencia relativa de 14% en la fase IV a 27% en la última fase.

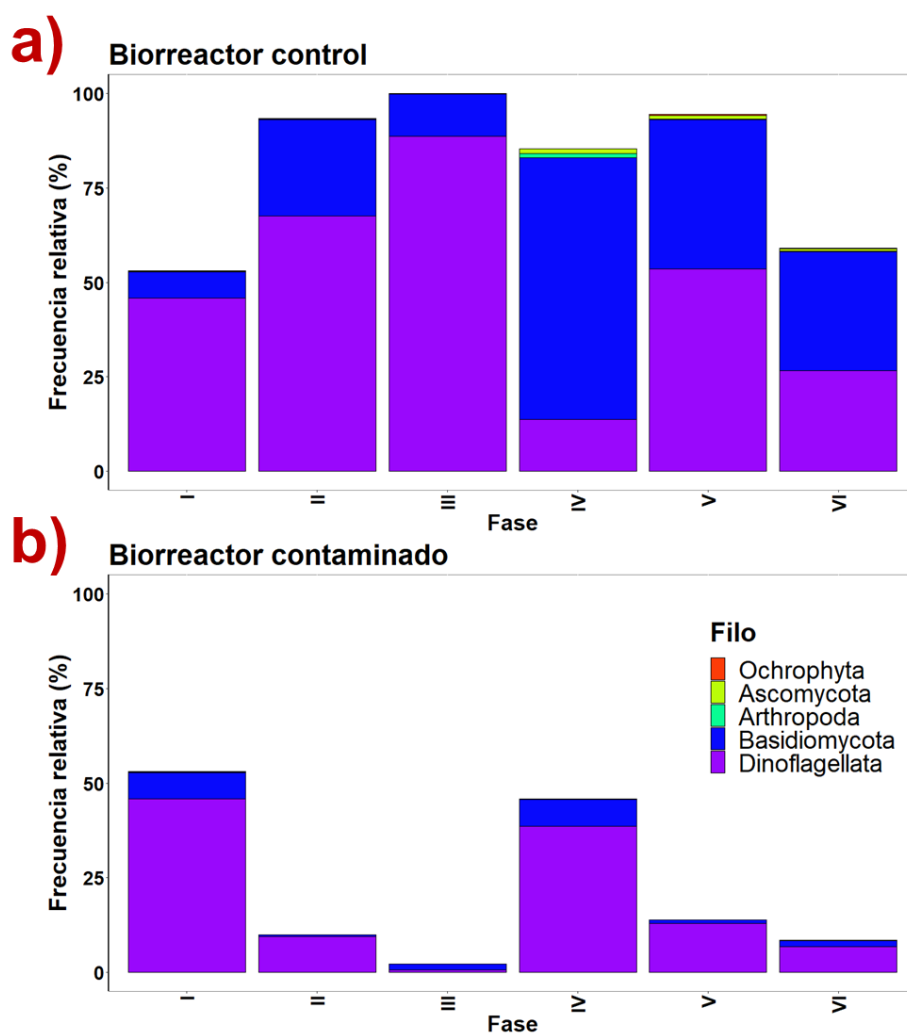


Fig. 9. Frecuencia relativa (%) de filo en las comunidades eucarióticas del a) biorreactor control y el b) biorreactor contaminado con metales pesados.

El patrón seguido por Dinoflagellata fue similar al patrón seguido por *Symbiodinium* en ambos biorreactores (Fig. 10).

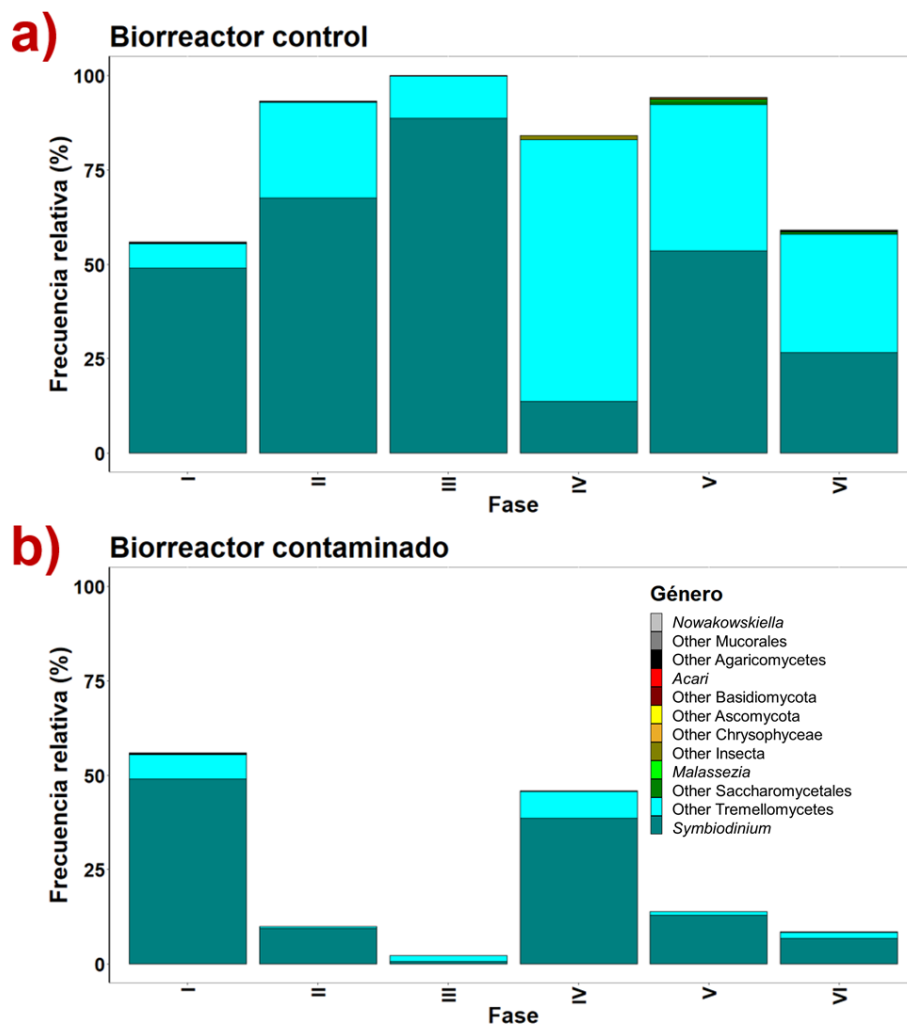


Fig. 10. Frecuencia relativa (%) de géneros de eucariontes del a) biorreactor control y el b) biorreactor contaminado con metales pesados.

El PCA de las comunidades eucarióticas demostró que el filo Dinoflagellata y el género *Symbiodinium* fueron favorecidos en el biorreactor control y que además hay una separación evidente entre ambos biorreactores (Fig. 11).

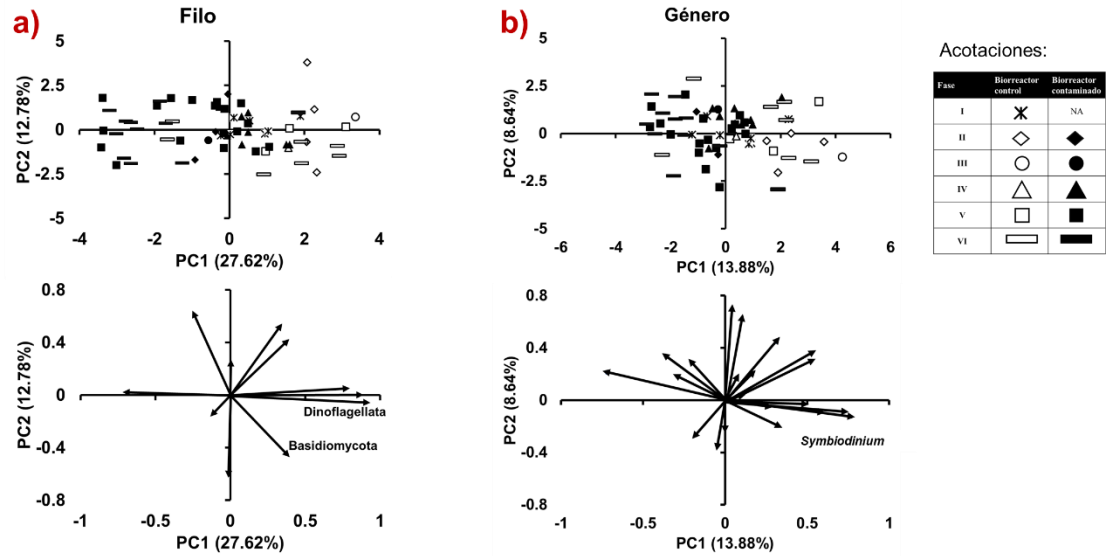


Fig. 11. Análisis de componentes principales a nivel a) filo y b) género de las comunidades eucarióticas de ambos biorreactores.

## 8.4 Diversidad Alfa

### 8.4.1 Diversidad alfa de las comunidades bacterianas

En la fase I se observó la mayor diversidad de todo el estudio. En la fase II la diversidad del biorreactor control fue menor que la del biorreactor contaminado para  $q=0$  (Fig. 12a) pero para  $q=1$  (Fig. 12 b) y  $q=2$  (Fig. 12 c) en la fase II, los valores en el biorreactor contaminado fueron menores que en el biorreactor control. A partir de la fase III la diversidad en el biorreactor control fue mayor que en el biorreactor contaminado.



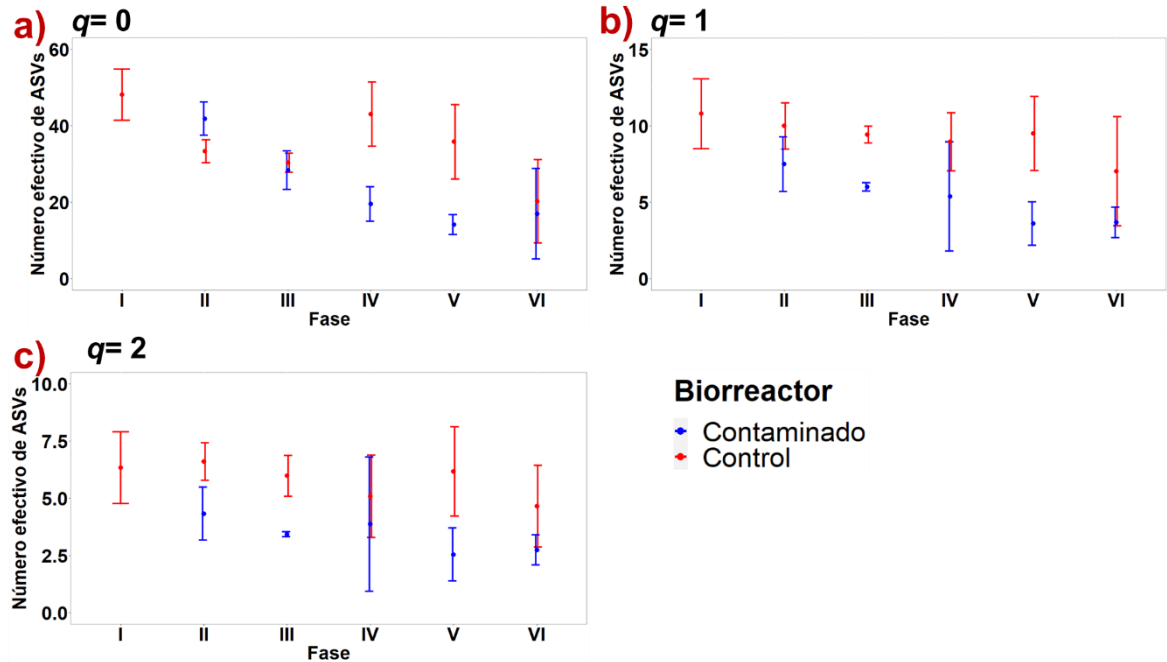


Fig. 12. Números Hill de las comunidades bacterianas en órdenes taxonómicos a)  $q=0$ , b)  $q=1$  y c)  $q=2$ .

*Las barras de error representan las diferencias entre las muestras en cada una de las fases. Biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado (azul).*

#### 8.4.2 Diversidad alfa de las comunidades eucarióticas

En todos los órdenes de diversidad taxonómica, la diversidad promedio en el biorreactor control fue mayor que en el biorreactor contaminado a partir de la fase II. Se puede observar que en la fase II la diversidad en el biorreactor control aumenta, mientras que en el biorreactor contaminado disminuye. Sin embargo, en la fase III tanto en el biorreactor control como el contaminado, la diversidad disminuye. Este patrón se observa en las fases siguientes en ambos biorreactores (Fig. 13).

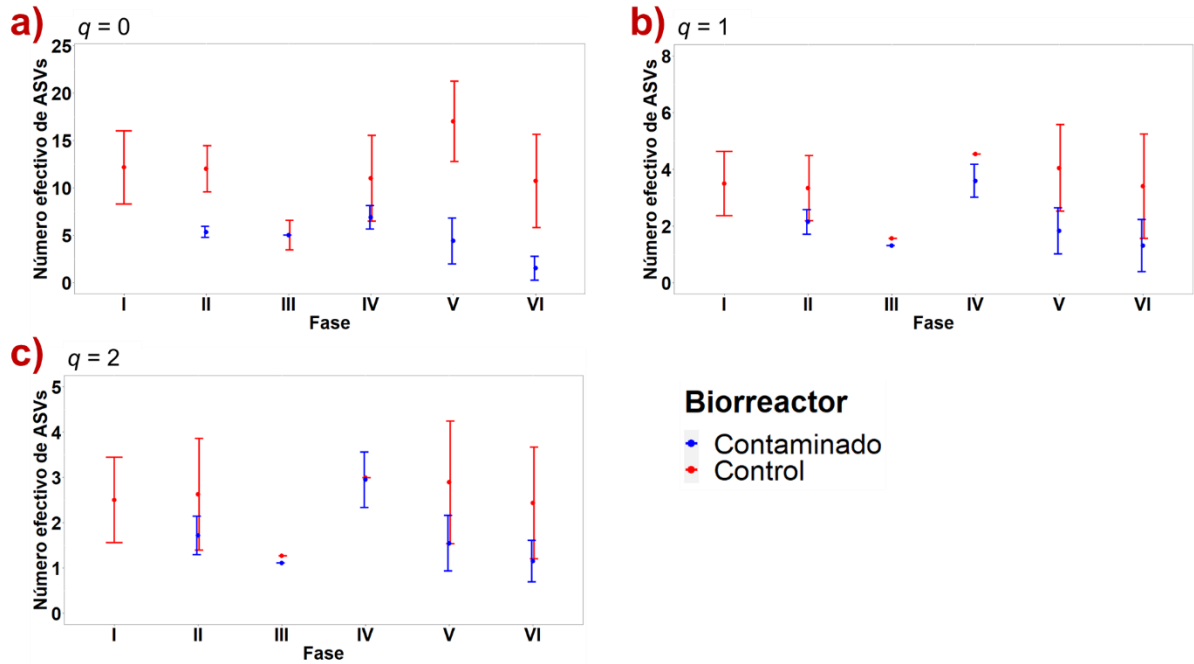


Fig. 13. Números Hill de las comunidades eucarióticas en órdenes de diversidad a)  $q=0$ , b)  $q=1$  y c)  $q=2$ .

*Las barras de error representan las diferencias entre las muestras en cada una de las fases. Biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado (azul).*

### 8.5 Predicción funcional de comunidades bacterianas

La predicción informó que las funciones más abundantes fueron las rutas metabólicas en ambos biorreactores principalmente el metabolismo de carbohidratos seguido por el metabolismo de aminoácidos donde el biorreactor control mostró mayor proporción promedio que en el biorreactor contaminado. Sin embargo, el biorreactor contaminado mostró mayor proporción promedio en procesamiento de información genética; replicación y reparo, transcripción y traducción a diferencia del biorreactor control (Fig. 14).

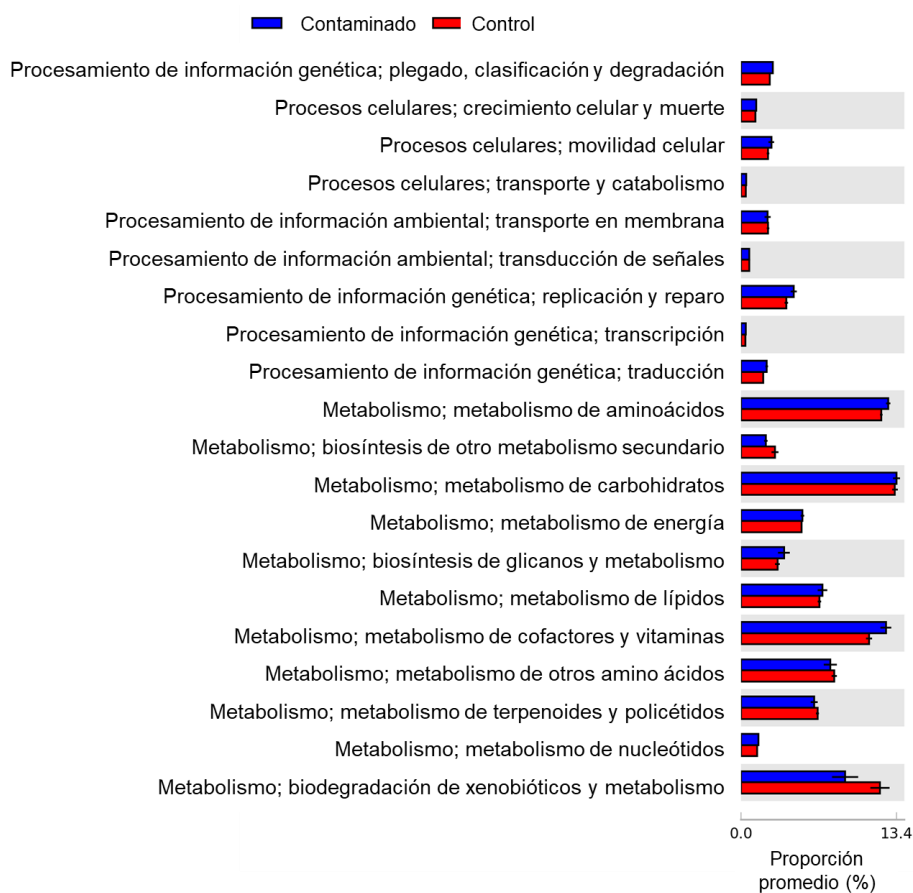


Fig. 14. Predicción funcional del biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado con metales pesados (azul) de las comunidades bacterianas.

## 8.6 Predicción funcional de comunidades eucarióticas

La predicción funcional de la comunidad eucariótica demostró que, similar a la predicción funcional de la comunidad bacteriana, los grupos de metabolismo de carbohidratos y aminoácidos son los más abundantes, sin embargo, a diferencia de la predicción funcional de las comunidades bacterianas, los procesos de información genética en el biorreactor contaminado tienen proporción promedio similar que en el biorreactor control (Fig. 15).

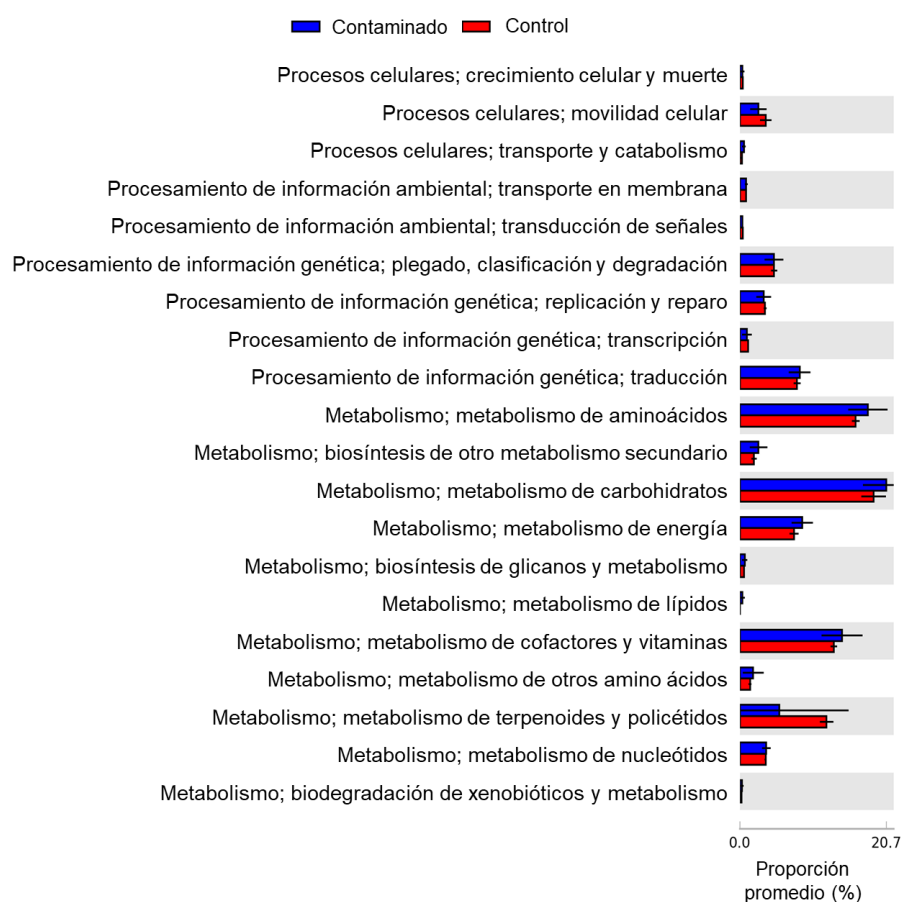


Fig. 15. Predicción funcional del biorreactor control (rojo) y el biorreactor contaminado con metales pesados (azul) de las comunidades eucarióticas.

## 9. Discusión

### 9.1 Parámetros químicos

Los metales pesados, como Cu, Ni y Zn son conocidos por inhibir la actividad biológica en los organismos vivos. Por ejemplo, Liu *et al.* (2020) encontraron que el Ni (II) en una concentración de 30 mg L<sup>-1</sup> disminuyó la remoción de DQO después de un largo tiempo de exposición (22-75 días) inhibiendo la actividad deshidrogenasa. Una concentración de Cu (II) de 10 mg L<sup>-1</sup> causó un efecto negativo en la remoción de DQO. Por ejemplo, Wang *et al.* (2018) reportaron que la remoción de DQO disminuyó hasta 85% en un biorreactor contaminado con 10 mg L<sup>-1</sup> de Cu (II), mientras que Sun *et al.* (2016) reportaron que el porcentaje de remoción de DQO fue mayor en el tratamiento con 20 mg Cu L<sup>-1</sup> (hasta 54% de remoción de DQO) que en el tratamiento con 40 mg Cu L<sup>-1</sup> (hasta 14%), concluyendo que el Cu a altas concentraciones afecta la eficiencia de la remoción de DQO. Wang *et al.*, (2009) encontraron que el Cu se une a enzimas como la ureasa y fosfatasa reduciendo su actividad enzimática y afectando de esta manera el ciclo del Fósforo. Wang *et al.* (2020) reportaron que, en un biorreactor inoculado con lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales, la remoción de DQO disminuye en un 5% en presencia de Zn (II) a diferencia de un biorreactor no contaminado. En este estudio, las crecientes concentraciones de metales pesados redujeron la remoción de DQO comparado con el biorreactor control.

Pamukoglu y Kargi (2007) reportaron que la concentración de la biomasa fue similar al final de un experimento llevado a cabo durante 30 días en un biorreactor contaminado con 14 mg Cu L<sup>-1</sup> comparado con un biorreactor no contaminado. Ellos indicaron que la biomasa puede adaptarse a la toxicidad de metales pesados, así como en este estudio, en donde la biomasa

incrementó conforme pasó el tiempo entre las fases en el biorreactor contaminado con metales pesados y fue similar en el biorreactor no contaminado al final del experimento (fase VI). Lo anterior sugiere que la biomasa puede adaptarse a una adición continua de Cu, Ni y Zn en el sistema a una  $IC_{50}$  máxima de 40% y que la actividad biológica es afectada negativamente a altas concentraciones de metales pesados, es decir, a  $IC_{50}$  al 100%, afectando de esta manera la concentración de la biomasa y la remoción de DQO.

## 9.2 Comunidad bacteriana

El filo más abundante fue Proteobacteria seguido de Bacteroidetes. Sharma *et al.* (2021) obtuvieron resultados similares en aguas residuales de una industria de papel contaminadas con metales pesados. Ellos indican que Proteobacteria juega un rol importante en una detoxificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el agua residual. Proteobacteria a menudo domina en diferentes ecosistemas, ya que es un filo con miembros muy versátiles y se puede encontrar en casi cualquier ecosistema en todo el mundo, desde agua fresca, agua salada hasta en el tracto gastrointestinal humano (Zhou *et al.*, 2020). Bacteroidetes es un filo heterótrofo que coloniza en diversos ambientes incluyendo suelo, océano y agua dulce. Algunos miembros de Bacteroidetes se conocen por degradar materia orgánica polimérica (Thomas *et al.*, 2011). Además, es un filo dominante en la microbiota intestinal (Rinninella *et al.*, 2019). La microbiota intestinal tiene una función esencial en la digestión de los alimentos a lo largo del tracto intestinal. El inóculo usado en ambos biorreactores se tomó de los lodos activados producidos en una planta de tratamientos de aguas residuales cuyas aguas residuales son principalmente

domésticas, lo cual explica la alta frecuencia relativa de Proteobacteria y Bacteroidetes en ambos biorreactores.

En las fases I, II y III, Alphaproteobacteria fue la clase más abundante y *Agrobacterium* fue el género más abundante, lo que sugiere que estos grupos pueden sobrevivir a las concentraciones de Cu, Ni y Zn cuando la IC<sub>50</sub> fue del 20%. Alphaproteobacteria puede ser encontrado en hábitats como suelo, océano y agua fresca. Se ha reportado que las Alphaproteobacterias a menudo son encontradas en lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales (Imhoff, 2006). *Agrobacterium* es un género de la clase de Alphaproteobacteria, es una bacteria Gram-negativa heterotrófica y usualmente es encontrada en suelos. *Agrobacterium* es un género conocido por causar tumores en las plantas. Se ha reportado que especies de *Agrobacterium* se han aislado de nódulos de plantas en minas contaminadas con metales pesados como Zn y Pb (Hao *et al.*, 2012; Jian *et al.*, 2019) y Au (Yu *et al.*, 2009). En este estudio, se encontró que *Agrobacterium* se mantuvo presente en los primeros 45 días de operación en el biorreactor contaminado, mientras que en el biorreactor control la presencia de *Agrobacterium* fue menor. Se ha reportado que especies de *Agrobacterium* poseen genes de resistencia a metales, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens* posee un regulador negativo de Zinc que se activa cuando los niveles de Zn son excesivos para la célula e inactiva los genes *znuABC* receptores de Zn con el fin de mantener la homeostasis en la célula (Chaoprasid *et al.*, 2016). Khafagi *et al.* (2012) encontraron que, en un humedal artificial como tratamiento primario de aguas residuales domésticas contaminadas con metales pesados como Ni (54.3 mg L<sup>-1</sup>), Cu (27.3 mg L<sup>-1</sup>), Zn (180.1 mg L<sup>-1</sup>), Cd (16.5 mg L<sup>-1</sup>) y Pb (35.2 mg L<sup>-1</sup>) durante 48 horas, algunas especies de *Agrobacterium* fueron capaces de acumular Ni, Pb y Zn, pero no Cu y Cd, similar a lo obtenido en este estudio, donde en las fases II, III y

parte de la fase IV *Agrobacterium* se mantuvo presente cuando el IC<sub>50</sub> era bajo, pero cuando la IC<sub>50</sub> aumentó a 20% la frecuencia relativa de *Agrobacterium* disminuyó a causa del aumento en la concentración de Cu.

En la fase V, la comunidad de Gammaproteobacteria incrementó en frecuencia relativa comparado con la fase IV, pero disminuyó en fase VI. Di Cesare *et al.* (2020) encontraron que Gammaproteobacteria fue la clase dominante (31%) en la superficie de un sedimento marino contaminado con una concentración de 14 mg Ni L<sup>-1</sup>, seguido de Alphaproteobacteria (10%). Sun *et al.* (2016) encontraron que la abundancia de Gammaproteobacteria se incrementa gradualmente cuando la concentración de Cu (II) se aumenta de 10 a 40 mg L<sup>-1</sup>. Wang *et al.* (2020) reportaron que los miembros de Proteobacteria, i.e. Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria, poseen el gen *CzcA*, el cual es el gen de resistencia a Cd, Co y Zn. Sin embargo, en Gammaproteobacteria se observó mayor abundancia relativa del gen *CzcA* que en Alphaproteobacteria, en una cámara usando como biomasa inicial lodos activados de una planta de tratamientos de aguas residuales municipales y bajo estrés de Zn(II) lo cual explica la alta frecuencia relativa de la clase Gammaproteobacteria en las últimas fases del biorreactor contaminado a diferencia de Alphaproteobacteria.

*Stenotrophomonas* es un género de la clase Gammaproteobacteria. Kuppusamy *et al.* (2016) reportaron que *Stenotrophomonas* es un género dominante en suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs por sus siglas en inglés) y posiblemente acelere la remoción de PAHs. Este género puede sobrevivir a altas concentraciones de metales pesados y otras condiciones adversas como salinidad y pH. *Stenotrophomonas* incrementa la actividad antioxidante en suelos contaminados con Cu (Gopi *et al.*, 2020) y puede remover más del 90% de DQO en aguas residuales (Al-Dhabi *et al.*, 2021). Se ha informado que especies de



*Stenotrophomonas* poseen genes de resistencia a metales como Cu (*copLAB*), Hg (*ohrAB*) y As (*arsC<sub>1</sub>HRC<sub>2</sub>B*) (Ryan *et al.*, 2009). En este estudio *Stenotrophomonas* fue el género más abundante en la fase IV, V y VI.

*Sphingobacteria* es un género del filo Bacteroidetes, es una bacteria Gram-negativa que ha sido encontrada en lodos de aguas residuales sintéticas contaminados con 4-clorofenol (Zhao *et al.*, 2016) y en suelos contaminados con PAHs (Smulek *et al.*, 2020), lo cual sugiere que *Sphingobacteria* puede sobrevivir a ambientes contaminados, tal como en este estudio en el cual *Sphingobacteria* tuvo una frecuencia relativa mayor en las últimas dos fases del biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn cuando la IC<sub>50</sub> era del 40% para la fase V y 100% en la fase VI que en las primeras cuatro fases.

### 9.3 Comunidades eucarióticas

*Symbiodinium* es un género del filo Dinoflagellata. Los miembros de *Symbiodinium* son organismos unicelulares fotosintéticos. Este género ha sido encontrado principalmente en el océano, ya que forma endosimbiosis con corales, donde *Symbiodinium* provee de oxígeno y compuestos orgánicos al coral como productos de la fotosíntesis, y el coral brinda protección. *Symbiodinium* ya ha sido identificado en lodos activados de aguas residuales municipales (He *et al.*, 2017). Bielmyer *et al.* (2010) encontraron que *Symbiodinium* en simbiosis con corales oceánicos puede ser tolerante a diversos factores ambientales estresantes como la presencia de metales pesados, a una concentración máxima de 20 µg Cu L<sup>-1</sup>. Sun *et al.* (2018) reportaron que, en un lodo activado de tratamiento de aguas residuales, bacterias, i.e. *Stenotrophomonas*,

podrían interactuar con algas como *Symbiodinium* para su crecimiento. Kuzminov *et al.* (2013) reportaron que una concentración de 3.2 mg L<sup>-1</sup> de Cu y 6.53 mg L<sup>-1</sup> de Zn provoca una inhibición en los fotosistemas I y II, y el transporte de electrones fotosintéticos muestra al inicio una aclimatación a los metales añadidos seguido de una disminución gradual en cepas de *Symbiodinium*. Este patrón fue similar al seguido por el género *Symbiodinium* en este estudio. En organismos fotosintéticos, la luz es necesaria para la fotosíntesis y energía para el mantenimiento celular. Si el transporte de electrones es inhibido, la célula colapsa.

#### *9.4 Diversidad Alfa*

Bhat *et al.* (2020) reportaron que la diversidad alfa de un biorreactor contaminado con 100 mg Cu L<sup>-1</sup> fue menor que al inicio del estudio cuando sólo contenía lodo activado proveniente de una planta de tratamientos de aguas residuales municipales, similar a los resultados obtenidos en el presente estudio. Lo anterior, podría deberse a que la alta concentración de metales pesados añadidas causó disminución de la diversidad, con respecto a las primeras fases del biorreactor contaminado. Además, diversidad del biorreactor control fue similar a la diversidad del biorreactor contaminado al final del estudio, lo cual sugiere que el sistema selecciona especies microbianas a través del tiempo.

La comunidad microbiana de los lodos activados está adaptada a las aguas residuales que a menudo contienen una variedad de metales pesados y otros componentes. En este estudio, el agua residual de entrada era sintética, contenía micronutrientes necesarios para el desarrollo de la actividad biológica. A diferencia del biorreactor control, al biorreactor contaminado se

añadieron concentraciones ascendentes de metales pesados (Ni, Cu y Zn) en cada fase del estudio, por lo cual en la fase II, donde la IC<sub>50</sub> de los metales pesados añadidos resultó beneficiosa. En esta fase, la diversidad alfa del biorreactor contaminado fue mayor que en el biorreactor control, pero fue en decremento a medida que transcurría el tiempo. En las últimas tres fases, la diversidad en el biorreactor control disminuyó hasta llegar a la fase VI donde la diversidad fue similar a la diversidad del biorreactor contaminado. Lo anterior supone que en el caso del biorreactor control, la diversidad disminuyó debido al cambio de agua residual a la que la comunidad estaba adaptada y en el biorreactor contaminado se atribuye a la ascendente concentración de Ni, Cu y Zn en cada fase.

### *9.5 Predicción funcional*

La predicción funcional demostró que las funciones metabólicas con mayor proporción fueron las rutas metabólicas del metabolismo en ambos biorreactores, debido a que son las funciones necesarias para las comunidades microbianas. Estos resultados ya han sido reportados anteriormente en procesos biológicos de lodos activados (More *et al.*, 2014; Ou *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). Li *et al.* (2020) encontraron que en sedimentos de un río contaminado con metales pesados como Ni en una concentración de 29.6 mg kg<sup>-1</sup>, Cu; 30.3 mg kg<sup>-1</sup>, y Zn; 127.6 mg kg<sup>-1</sup>, la ruta metabólica de transporte de membrana tuvo una correlación positiva, indicando que los microorganismos pueden transportar iones metálicos a través de las membranas para su sobrevivencia e incluso generar resistencia a dichos metales, además que las funciones genéticas fueron afectadas negativamente. En este estudio, el transporte en la membrana en el biorreactor contaminado fue similar a la proporción del biorreactor control, y

las funciones genéticas como replicación, traducción y transcripción fueron afectadas positivamente, lo cual sugiere que los iones metales pueden atravesar la membrana de los organismos resistentes sin afectar negativamente las funciones de información genética. Un estudio realizado por Lin *et al.* (2019) reportaron que los procesos de información genética fueron más abundantes en las muestras de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales contaminados con Pb, Hg y As, a diferencia de muestras no contaminadas. Lo anterior sugiere que los organismos resistentes a metales pesados tienen mayor procesamiento de información genética. Los organismos generan mecanismos de defensa ante la presencia de metales pesados, como la expresión de genes de resistencia, y por ello, se requiere de más procesamiento de información genética como replicación y reparo, transcripción y traducción.

## 10. Conclusiones

En este estudio se pudo observar que la biomasa, proveniente del lodo activado de una planta de tratamiento de aguas residuales, es capaz de adaptarse a la adición de metales pesados, como Ni, Cu y Zn, en el sistema excepto a una  $IC_{50}$  del 100%. Además, que Gammaproteobacteria puede resistir altas concentraciones de metales pesados, así como los géneros bacterianos *Stenotrophomonas* y *Sphingobacterium* y el género algae *Symbiodinium* del filo Dinoflagellata. La predicción de funcionalidad reveló que los metales pesados no inhiben las rutas metabólicas centradas en el metabolismo, y que los procesos de información genética fueron afectados positivamente por los metales pesados en el biorreactor contaminado a diferencia del biorreactor control donde la proporción relativa fue menor. De manera general,

los metales pesados como Ni, Cu y Zn no son dañinos para los microorganismos a bajas concentraciones, y puede ayudar a las funciones centrales del metabolismo y procesamiento genético.

## 11. Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo estudio de metagenoma para conocer con certeza la funcionalidad de las comunidades microbianas del biorreactor contaminado con Ni, Cu y Zn a diferencia del biorreactor no contaminado, principalmente en las últimas tres fases donde (fase IV, V y VI) donde se muestra la mayor variabilidad de diversidad.

## 12. Bibliografía

- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Alzeer, A. F., & Arasu, M. V. (2021). Removal of nitrogen from wastewater of date processing industries using a Saudi Arabian mesophilic bacterium, *Stenotrophomonas maltophilia* Al-Dhabi-17 in sequencing batch reactor. *Chemosphere*, *268*, 128636. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128636>
- Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *71*(July), 103220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>
- Banos, S., Lentendu, G., Kopf, A., Wubet, T., Glöckner, F. O., & Reich, M. (2018). A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiology*, *18*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1331-4>
- Bhat, S. A., Cui, G., Li, W., Wei, Y., & Li, F. (2020). Effect of heavy metals on the performance and bacterial profiles of activated sludge in a semi-continuous reactor. *Chemosphere*, *241*, 125035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125035>
- Bielmyer, G. K., Grosell, M., Bhagooli, R., Baker, A. C., Langdon, C., Gillette, P., & Capo, T. R. (2010). Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium* spp.). *Aquatic Toxicology*, *97*(2), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.021>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A.

- M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borneman, J., & Hartin, R. J. (2000). PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4356–4360. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4356-4360.2000>
- Cabrera, G., Pérez, R., Gómez, J. M., Ábalos, A., & Cantero, D. (2006). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of Hazardous Materials*, 135(1–3), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.058>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chao, Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sander, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., & Ellison, A. M. (2014). Rarefaction and Extrapolation with Hill Numbers: A Framework for Sampling and Estimation in Species Diversity Studies The Harvard community has made this article openly available. Please share how this access benefits you. Your story matters. *Ecological Monographs*, 84(1), 45–67.
- Chaoprasid, P., Dokpikul, T., Johnrod, J., Sirirakphaisarn, S., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2016). *Agrobacterium tumefaciens* Zur regulates the high-affinity zinc uptake system TroCBA and the putative metal chaperone YciC, along with ZinT and ZnuABC, for survival under zinc-limiting conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3503–3514. <https://doi.org/10.1128/AEM.00299-16>

- Cokgor, E. U., Ozdemir, S., Karahan, O., Insel, G., & Orhon, D. (2007). Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 139(2), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.038>
- Contreras, E. M., Bertola, N. C., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. E. (2002). A modified method to determine biomass concentration as COD in pure cultures and in activated sludge systems. *Water SA*, 28(4), 463–467. <https://doi.org/10.4314/wsa.v28i4.4920>
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 35–56. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)
- Di Cesare, A., Pjevac, P., Eckert, E., Curkov, N., Miko Šparica, M., Corno, G., & Orlić, S. (2020). The role of metal contamination in shaping microbial communities in heavily polluted marine sediments. *Environmental Pollution*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114823>
- Diepinois, G., Ducret, V., Caille, O., & Perron, K. (2012). The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038148>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Esquivel-Rios, I., González, I., & Thalasso, F. (2014). Microrespirometric characterization of activated sludge inhibition by copper and zinc. *Biodegradation*, 25(6), 867–879.



<https://doi.org/10.1007/s10532-014-9706-1>

Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 167–176.

<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>

Fulekar, M. H., Sharma, J., & Tendulkar, A. (2012). Bioremediation of heavy metals using biostimulation in laboratory bioreactor. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(12), 7299–7307. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2499-3>

García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R. R., Guerrero, A., Mendoza-Vargas, A., Gómez-Gil, B., & Ochoa-Leyva, A. (2020). Doing more with less: A comparison of 16S hypervariable regions in search of defining the shrimp microbiota. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010134>

Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). *Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional*. 8(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>

Gopi, K., Jinal, H. N., Prittesh, P., Kartik, V. P., & Amaresan, N. (2020). Effect of copper-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* on maize (*Zea mays*) growth, physiological properties, and copper accumulation: potential for phytoremediation into biofortification. *International Journal of Phytoremediation*, 22(6), 662–668. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1707161>

Gunatilake, S. K. (2015). *Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater*. 1(1), 12–18.

- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., & Thompson, E. M. (2014). Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLoS ONE*, 9(2), 87624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- Hao, X., Xie, P., Johnstone, L., Miller, S. J., Rensing, C., & Wei, G. (2012). Genome sequence and mutational analysis of plant-growth-promoting bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 isolated from a zinc-lead mine tailing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5384–5394. <https://doi.org/10.1128/AEM.01200-12>
- Herlemann, D., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Hernandez-Martinez, G. R., Ortiz-Alvarez, D., Perez-Roa, M., Urbina-Suarez, N. A., & Thalasso, F. (2018). Multiparameter analysis of activated sludge inhibition by nickel, cadmium, and cobalt. *Journal of Hazardous Materials*, 351(October 2017), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.032>
- Imhoff, J. (2006). The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In *The Prokaryotes* (5th ed., pp. 41–64). Springer.
- Jang, H. M., Lee, J., Choi, S., Shin, J., Kan, E., & Kim, Y. M. (2018). Response of antibiotic and heavy metal resistance genes to two different temperature sequences in anaerobic digestion of waste activated sludge. *Bioresour. Technol.*, 267(May), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.051>
- Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., & Li, Z. (2019). Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under

- copper and zinc stress. *PeerJ*, 2019(5), 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.6875>
- Kabata-Pendias. (2011). Trace Elements in Soils and Plants. In *British Medical Journal* (Third edit, Vol. 2, Issue 4640). Press, CRC. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4640.1355-a>
- Khafagi, I., Dewedar, A., Rashad, A., & Abo-Seda, A. (2012). Competence of *Agrobacterium rhizogenes* to accumulate heavy metals and toxicity of cadmium and copper to *Agrobacterium* strains. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 7(1), 57–67.
- Kieu, H. T. Q., Mu, E., & Horn, H. (2011). *Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria*. 5, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.043>
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., & Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, 17(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., & Naidu, R. (2016). Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in soils contaminated long-term with PAHs and heavy metals: Implications to bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 317, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.066>
- Kuzminov, F. I., Brown, C. M., Fadeev, V. V., & Gorbunov, M. Y. (2013). Effects of metal toxicity on photosynthetic processes in coral symbionts, *Symbiodinium* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446, 216–227.

<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.05.017>

Li, C., Quan, Q., Gan, Y., Dong, J., Fang, J., Wang, L., & Liu, J. (2020). Effects of heavy metals on microbial communities in sediments and establishment of bioindicators based on microbial taxa and function for environmental monitoring and management. *Science of the Total Environment*, 749, 141555. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141555>

Li, D. (2018). hillR: taxonomic, functional and phylogenetic diversity and similarity through Hill Numbers. *The Journal of Open Source Software*, 3(13), 1041. <https://doi.org/https://doi.org/10.21105/joss.01041>

Li, M., Ren, L., Zhang, J., Luo, L., Qin, P., Zhou, Y., Huang, C., Tang, J., Huang, H., & Chen, A. (2019). Population characteristics and influential factors of nitrogen cycling functional genes in heavy metal contaminated soil remediated by biochar and compost. *Science of The Total Environment*, 651, 2166–2174. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.152>

Lin, H., Jiang, L., Li, B., Dong, Y., He, Y., & Qiu, Y. (2019). Screening and evaluation of heavy metals facilitating antibiotic resistance gene transfer in a sludge bacterial community. *Science of the Total Environment*, 695, 133862.

Liu, R., Li, S., Yu, N., Zhao, C., Gao, X., & Gao, C. (2020). Performance evaluation and microbial community shift of sequencing batch reactors under different nickel (Ni(II)) concentrations. *Environmental Technology and Innovation*, 19(238), 100991. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100991>

Mahapatra, B., Kumar, N., Pradhan, A., & Prasad, B. (2020). Materials Today : Proceedings Application of bacterial extracellular polymeric substances for detoxification of heavy

- metals from contaminated environment : A mini-review. *Materials Today: Proceedings*, xxx, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.490>
- Metcalf and Eddy. (1991). *Ingeniería de aguas residuales. Volumen I: Tratamiento, vertido y reutilización*. (G. Metcalf, L., Eddy, H. P., & Tchobanoglous (ed.); 4th ed.). McGraw-Hill.
- More, R. P., Mitra, S., Raju, S. C., Kapley, A., & Purohit, H. J. (2014). Mining and assessment of catabolic pathways in the metagenome of a common effluent treatment plant to induce the degradative capacity of biomass. *Bioresource Technology*, 153, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.065>
- Ou, D., Li, W., Li, H., Wu, X., Li, C., Zhuge, Y., & Liu, Y. di. (2018). Enhancement of the removal and settling performance for aerobic granular sludge under hypersaline stress. *Chemosphere*, 212, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.096>
- Pamukoglu, M. Y., & Kargi, F. (2007). Copper(II) ion toxicity in activated sludge processes as function of operating parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.005>
- Parades-Aguilar, J., Reyes-Martínez, V., Bustamante, G., Almendáriz-Tapia, F. J., Martínez-Meza, G., Vílchez-Vargas, R., Link, A., Certucha-Barragán, M. T., & Calderón, K. (2021). Removal of nickel(II) from wastewater using a zeolite-packed anaerobic bioreactor: Bacterial diversity and community structure shifts. *Journal of Environmental Management*, 279(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111558>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). *Genome analysis STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles*. 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

- Popovic, A., Bourdon, C., Wang, P. W., Guttman, D. S., Voskuijl, W., Grigg, M. E., Bandsma, R. H. J., & Parkinson, J. (n.d.). *Design and application of a novel two-amplicon approach for defining eukaryotic microbiota*. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0612-3>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Sambrook, J., & Russel, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. In *Dong wu xue yan jiu = Zoological research / “Dong wu xue yan jiu” bian ji wei yuan hui bian ji* (3rd editio, Vol. 33, Issue 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1141.2012.01075>
- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S. I., Saratale, G. D., & Bharagava, R. N. (2020). Phytoremediation of heavy metal-contaminated sites: Eco-environmental concerns, field studies, sustainability issues, and future prospects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 249, 71–131. [https://doi.org/10.1007/398\\_2019\\_24](https://doi.org/10.1007/398_2019_24)
- Sharma, P., Tripathi, S., & Chandra, R. (2021). Metagenomic analysis for profiling of microbial communities and tolerance in metal-polluted pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, 324(January), 124681.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124681>

Smulek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>

Su, J., Gao, J., lin Huang, T., & ming Zhang, Y. (2020). Simultaneous nitrate, nickel ions and phosphorus removal in a bioreactor containing a novel composite material. *Bioresource Technology*, 305, 123081. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123081>

Sun, F. L., Fan, L. L., & Xie, G. J. (2016). Effect of copper on the performance and bacterial communities of activated sludge using Illumina MiSeq platforms. *Chemosphere*, 156, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.117>

Sun, L., Zuo, W., Tian, Y., Zhang, J., Liu, J., Sun, N., & Li, J. (2018). *Performance and microbial community analysis of an algal-activated sludge symbiotic system: Effect of activated sludge concentration*. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.010>

Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>

Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., Dendooven, L., & Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, 12(2), 247–254. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0121-y>

- Wadhawan, S., Jain, A., Nayyar, J., & Mehta, K. (2019). *Role of nanomaterials as adsorbents in heavy metal ion removal from waste water: A review*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101038>
- Wang, Qian, Lv, R., Rene, E. R., Qi, X., Hao, Q., Du, Y., Zhao, C., Xu, F., & Kong, Q. (2020). Characterization of microbial community and resistance gene (CzcA) shifts in up-flow constructed wetlands-microbial fuel cell treating Zn (II) contaminated wastewater. *Bioresource Technology*, 302(November 2019), 122867.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122867>
- Wang, QY., Zhou, D., & L., C. (2009). Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1504–1509. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.010>
- Wang, Z., Xia, P., Gao, M., Ma, K., Deng, Z., Wei, J., Zhang, J., Wang, L., Zheng, G., Yang, Y., Chen, J., & Wang, Y. (2018). Long-term effects of combined divalent copper and tetracycline on the performance, microbial activity and community in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 249(10), 916–923.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.006>
- Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., & Qiao, Z. (2020). Activated sludge microbial community and treatment performance of wastewater treatment plants in industrial and municipal zones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/ijerph17020436>
- Yin, Y., Gu, J., Wang, X., Song, W., Zhang, K., Sun, W., Zhang, X., Zhang, Y., & Li, H. (2017). Effects of copper addition on copper resistance, antibiotic resistance genes, and intl1



- during swine manure composting. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00344>
- Yu, J., Fan, L., Yang, S., Tang, M., Yang, W., Li, H., & Wei, G. (2009). Characterization of copper-resistant *Agrobacterium* isolated from legume nodule in mining tailings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(3), 354–357.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-008-9598-z>
- Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., & Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. *Chemical Engineering Journal*, 398, 125657.  
<https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.125657>
- Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, 618, 1254–1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>
- Zhao, J., Chen, X., Bao, L., Bao, Z., He, Y., Zhang, Y., & Li, J. (2016). Correlation between microbial diversity and toxicity of sludge treating synthetic wastewater containing 4-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Chemosphere*, 153, 138–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.086>
- Zhou, Z., Tran, P. Q., Kieft, K., & Anantharaman, K. (2020). Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. *ISME Journal*, 14(8), 2060–2077. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0669-4>