



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**“Diversidad metabólica y genética de la comunidad bacteriana  
en un reactor de lecho móvil  
para el tratamiento de efluentes acuícolas”**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

Presenta

**INGENIERA BIOQUÍMICA MARÍA DEL CARMEN CANO CORREA**

Asesor

**DOCTOR EN INGENIERÍA DE PROCESOS JULIO CÉSAR ORANTES ÁVALOS**

**Morelia Michoacán, octubre de 2017**



## **Agradecimientos**

A mi mamá, por el apoyo incondicional que he recibido de su parte en cada una de las decisiones que he tomado. Por su cariño y comprensión, por estar siempre dándome ánimos y tenerme presente en cada una de sus oraciones. A mi papá que, a pesar de nuestra distancia física, siento que siempre está conmigo y aunque nos faltó tanto por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para él como lo es para mí.

A mis hermanos por todo lo compartido desde pequeños. A mi hermana por siempre estar aconsejándome y a mi hermano por siempre estar pendiente de que esté bien, por sus mensajes que siempre me recuerdan que no hay nada más importante que la unión familiar para salir adelante.

Al laboratorio de biología Acuática de la UMSNH, así como al programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por permitirme formar parte de este programa y trabajar en estas instalaciones.

Al programa CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca proporcionada durante estos dos años y por el apoyo para la realización de una estancia de investigación.

A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, por el financiamiento del proyecto: “Remoción de nitrógeno amoniacal, en sistemas acuícolas recirculados de cultivo de peces”.

A la Coordinación General del Posgrado de la UMSNH, al “Programa del Fortalecimiento de la Calidad Educativa” y a la DES de Ciencias biológico-agropecuarias y a la facultad de ingeniería química, por el apoyo recibido para realizar la estancia de Investigación en la Universidad de Chile.

Al Dr. Julio César Orantes, por aceptarme como parte de su equipo de investigación, por su apoyo brindado y por todos sus conocimientos compartidos.

A la Dra. Yvonne Herrerías, al Dr. Javier Ponce, al Dr. Gerardo Marrufo y al M.C. Gabriel Martínez por formar parte de mi mesa tutorial y hacer que camináramos juntos durante esta investigación.

Al Dr. Andrei Rosales por su apoyo brindado en este proyecto de investigación.

A la Dra. Soledad Vázquez y todo su equipo de trabajo, por la disponibilidad del laboratorio de genética molecular microbiana UMSNH.

Al Dr. Hernando Rodríguez Correa y al laboratorio de genética molecular de la ENES- UNAM campus Morelia por su apoyo incondicional en el acondicionamiento de las muestras para la estancia.

A la Dra. Julieta Orlando y todo su equipo de investigación, que me acogieron como parte de él durante mi estancia de investigación en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Chile.

A mis compañeros y amigos Diana, Víctor, Daniel y Alejandro, gracias por hacer más amenas las largas jornadas de investigación.

## **Tabla de contenido**

Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de símbolos abreviaturas o nomenclatura .....	xiii
Resumen .....	xiv
Abstract.....	xv
I.-Introducción.....	1
II.- Justificación.....	3
III- Marco teórico.....	4
3.1.- La acuicultura .....	4
3.1.1.- Estado actual y problemas ambientales.....	4
3.1.2.- Acuicultura mediante RAS .....	5
3.1.3.- Estructura de un RAS .....	6
3.2.- RLM como herramienta en el tratamiento de efluentes acuícolas .....	7
3.2.1.- Procesos biológicos de tratamiento de agua en un RAS .....	7
3.2.2.- Funcionamiento de un RLM .....	8
3.2.3.-Ventajas de los Reactores de lecho móvil (RLM) .....	10
3.2.4.-Parámetros de diseño y operación.....	10
3.3.- Dinámica de comunidades bacterianas .....	12
3.3.1.- Composición de la biopelícula .....	13
3.3.2.- Remoción biológica de nitrógeno.....	13
3.3.3.- Factores que intervienen en la remoción biológica de nitrógeno .....	16
3.3.4.- Identificación de comunidades bacterianas .....	17
3.3.5- Análisis de la diversidad metabólica de la comunidad mediante Biolog Ecoplate .....	18
3.3.6- Estructura genética de la comunidad a través del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales (TRFLP).....	19
IV.- Marco conceptual de la investigación .....	20
4.1.- Hipótesis.....	20

4.2.- Objetivo .....	20
4.2.1.- Objetivo general .....	20
4.2.2.- Objetivos específicos .....	20
V.- Materiales y Métodos .....	21
5.1.- Plan experimental .....	21
5.2.- Preparación del efluente acuícola sintético .....	21
5.3.- Descripción del RLM.....	21
5.4.- Inoculación del RLM .....	22
5.5.- Operación y medición de parámetros .....	22
5.6.- Análisis de muestras.....	23
5.7.- Desprendimiento de la biopelícula.....	25
5.8.- Análisis del perfil metabólico (CLPP) de las comunidades bacterianas.....	25
5.9.- Estructura de la comunidad .....	29
5.9.1.- Extracción de DNA.....	29
5.9.2.- Amplificación por PCR .....	30
5.9.3.- T-RFLP .....	32
VI.- Resultados.....	34
6.1.- Seguimiento de parámetros fisicoquímicos del reactor .....	34
6.1.1.- Temperatura y pH. ....	34
6.1.2.- Remoción de nitrógeno amoniacal y DQO.....	35
6.2.- Efecto de la relación C/N y los efluentes sobre el perfil metabólico .....	38
6.3.- Análisis de degradación por grupos .....	40
6.4.- Análisis de la diversidad metabólica .....	41
6.5.- Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen 16S .....	47
6.6.- Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen beta-amó.....	51
6.7.- Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen nirS .....	55
VII. – Discusión de resultados.....	59
7.1.- Remoción de contaminantes en el reactor de lecho móvil.....	59
7.1.1. Nitrificación.....	59

7.1.2. Desnitrificación .....	60
7.1.3. Remoción biológica de nitrógeno en el RLM del RAS.....	61
7.1.4. Remoción de materia orgánica .....	62
7.2.- Diversidad metabólica de la biopelícula del RLM .....	62
7.2.1. Diversidad metabólica y relaciones C/N.....	62
7.2.2. Degradación de los sustratos en la placa y su relación con el RLM.....	63
7.2.3. Diversidad y equitatividad de Shannon asociados a la capacidad degradativa del RLM .....	65
7.2.4. Factores fisicoquímicos que influyeron en la capacidad degradativa...	66
7.3.- Estructura de la comunidad de la biopelícula del RLM .....	67
7.3.1. Estructura de la comunidad y relaciones C/N .....	67
7.3.2. Estructura de la comunidad y los procesos de remoción biológica de nitrógeno en el RLM.....	68
VIII. – Conclusiones .....	70
IX. – Recomendaciones .....	71
X.- Referencias.....	72
Anexo A.- Valores p para la prueba t de Hutchenson, para el índice de Shannon de la diversidad metabólica.....	80
Anexo B.- Valores p para la prueba t de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen 16S.....	82
Anexo C.- Valores p para la prueba t de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen beta-amo. ....	84
Anexo D.- Valores p para la prueba t de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen NirS. ....	86

## Lista de Tablas

Tabla 3.1	Parámetros de operación para reactores de lecho móvil, usando efluentes acuícolas y acuícolas sintéticos	11
Tabla 3.2	Parámetros típicos de diseño para reactores de lecho móvil para aguas residuales domesticas (adaptado de Metcalf y Eddy, 2003).	12
Tabla 3.3	Parámetros fisicoquímicos que intervienen en la remoción de amonio	16
Tabla 5.1	Parámetros de diseño del reactor de lecho móvil	24
Tabla 5.2	Parámetros determinados y metodología usada	25
Tabla 5.3	Código de las muestras que se trabajaron con los dos sustratos y las dos relaciones C/N	25
Tabla 5.4	Fórmulas para calcular los índices de diversidad metabólica	28
Tabla 5.5	Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los genes	31
Tabla 6.1	Parámetros de operación del reactor de lecho móvil a las diferentes relaciones C/N con cada uno de los efluentes acuícolas (n=9) (media ± Desviación estándar)	34
Tabla 6.2	Concentraciones de DQO, N-NH <sub>3</sub> Y N-NO <sub>4</sub> en la entrada y salida del reactor (media ± Desviación Estándar, n=3)	35
Tabla 6.3	Porcientos de remoción de CA (Carga Amoniacal) sin diferencia estadísticamente significativa (p= 0.0647) y CO (Carga Orgánica) con diferencia estadísticamente significativa (p= 0.0371*) para cada una de las condiciones experimentales (media ± Desviación Estándar, n=3).	36
Tabla 6.4	Resumen del ANOVA de dos vías comparando las condiciones experimentales, correspondientes a las remociones de contaminantes, y parámetros de respuesta del RLM	37

Tabla 6.5	Valores del AWCD promedio con su desviación estándar en cada una de las muestras (n=3)	39
Tabla 6.6	Resumen ANOVA de dos vías para el AWCD en los tres puntos para cada condición experimental	40
Tabla. 6.7	Equitatividad y sustratos degradados de cada una de las muestras con las diferentes condiciones experimentales (n=3)	43
Tabla. 6.8	índice de Shannon, equitatividad y TRFs para el gen 16S de cada una de las condiciones experimentales trabajadas (n=3). Donde Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).	49
Tabla. 6.9	índice de Shannon, equitatividad y TRFs para el gen beta-amo de cada una de las condiciones experimentales trabajadas (n=3). Donde Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).	52
Tabla. 6.10	Equitatividad y sustratos degradados de cada una de las muestras con las diferentes condiciones experimentales (n=3).	56

## Lista de Figuras

Figura 3.1	Operaciones unitarias que pueden conformar un sistema acuícola con recirculación (RAS). Adaptado de (Timmons <i>et al.</i> , 2012)	6
Figura 3.2	Principio de funcionamiento de los reactores de lecho móvil. Tomada de (Rusten <i>et al.</i> , 2006, Ødegaard, 1999)	9
Figura 3.3	Ciclo del nitrógeno en el agua tomado de Nature education (2010), modificado y complementado de (Lüke <i>et al.</i> , 2016; Madigan <i>et al.</i> , 2009).	14
Figura 5.1	Reactor de lecho móvil piloto, con capacidad de 40 L	22
Figura 5.2	Dilución de la biopelícula y siembra en agar de soya tripticasa para estandarizar el volumen inoculado en las placas Biolog Ecoplate™	26
Figura 6.1	Desarrollo de color promedio (AWCD) de los sustratos metabolizados por la biopelícula (n=3), medido por un tiempo de al menos 120 h, con las diferentes condiciones experimentales a) Efluente AA relación C/N=1, b) Efluente AA relación C/N=10, c) Efluente G, relación C/N=1 d) Efluente G, relación C/N= 10	38
Figura 6.2	Análisis de componentes principales de las fuentes de carbono aprovechadas por grupo por la comunidad de la biopelícula con las diferentes condiciones experimentales a las diferentes horas (24, 64 y 120). Los grupos son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , PERMANOVA).	41
Figura 6.3	Índices de Shannon en cada de las condiciones experimentales en los diferentes tiempos, 24, 64 y 120 (n=3).	42
Figura 6.4	Diversidad Beta, Formación de grupos, por efluentes, Bray-Curtis (0.723)	44

Figura 6.5	Diversidad Beta, Formación de grupos, por efluentes, Bray-Curtis (0.7034)	44
Figura 6.6	Diversidad Beta, Formación de grupos, por efluentes, Bray-Curtis (0.7045)	44
Figura 6.7	Análisis de correspondencia canónica entre el perfil metabólico de la comunidad y los parámetros de operación del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas trabajadas.	46
Figura 6.8	Análisis de correspondencia canónica entre el perfil metabólico de la comunidad por grupos y la respuesta del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas trabajadas	57
Figura 6.9	Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido de cada condición experimental (n=3). Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, HaeIII; Hh: HhaI). Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).	48
Figura 6.10	Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen 16S obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA	49
Figura 6.11	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen 16S y los parámetros medidos de las comunidades	51

bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen 16S obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI).

- Figura 6.12 Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido para el gen *beta-amo* (n=3). Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, HaeIII; Hh: HhaI). Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa). 52
- Figura 6.13 Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *beta-amo* obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA 54
- Figura 6.14 Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen *beta-amo* y los parámetros medidos de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *beta-amo* obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). 55
- Figura 6.15 Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido para el gen *nirS*. Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, HaeIII; Hh: HhaI). Cada condición 56

experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).

Figura 6.16      Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *nirS* obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA 58

Figura 6.17      Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen *nirS* y los parámetros medidos de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreadas. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *nirS* obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). 58

## Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclatura

Notación	Descripción	Unidades
RAS	Sistemas acuícolas recirculados	-
C/N	Relación carbono nitrógeno	kgDDO/ kgNH <sub>3</sub>
T-RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales	-
RLM	Reactor de lecho móvil	-
TRH	Tiempo de retención hidráulico	h
TRC	<i>Tiempo de retención celular</i>	d
CH	<i>Carga hidráulica</i>	m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .d
CO	Carga Orgánica	gDQO/m <sup>2</sup> .d
CA	Carga Amoniacal	gN-NH <sub>3</sub> /m <sup>2</sup> .d
DQO	Demanda Química de Oxígeno	mg/l
AOB	Bacterias amonioxidantes	
NOB	Bacterias oxidantes de los nitritos	
OD	Oxígeno Disuelto	mg/l
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	
AWCD	Desarrollo de color promedio	Absorbancia
CCA	Análisis de Correspondencia Canónica	-
PCA	Análisis de Componentes Principales	-
TRFs	Fragmentos de Restricción Terminal	-
SVb	Sólidos Volátiles en la biopelícula	mg/L

## Resumen

En este estudio se evaluó la influencia de la relación C/N sobre la estructura y la diversidad metabólica de una comunidad microbiana en el proceso de tratamiento de dos efluentes acuícolas sintéticos mediante un reactor de lecho móvil (RLM) a escala laboratorio.

Se trabajó con un RLM operado en continuo, alimentado con dos efluentes sintéticos completamente solubles y fácilmente biodegradables, cada uno con dos relaciones C/N en el sustrato de alimentación. La diversidad metabólica de la comunidad se midió mediante el uso de placas Ecoplate® de BIOLOG™. La estructura de la comunidad se analizó mediante la técnica TRFLP, para los genes 16S, *beta-amo* y *nirS*.

Primeramente, se aseguró la calidad del efluente tratado, ya que se obtuvieron porcentajes superiores al 98 % de remoción de nitrógeno amoniacal y superiores al 82 % de remoción de materia orgánica. La eficiencia de remoción tanto de nitrógeno amoniacal como de materia orgánica aumentó al incrementar la relación C/N, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la remoción del nitrógeno amoniacal entre las diferentes condiciones experimentales.

Se concluye que tanto la relación C/N, como la fuente de carbono de los efluentes tratados mostraron tener una influencia en la diversidad funcional de la biopelícula y en la estructura de la comunidad bacteriana; así como también que a través de la relación C/N se puede orientar la operación del RLM hacia los procesos biológicos deseados en función del tipo de contaminante que se pretenda remover en el efluente acuícola.

**Palabras claves:** biopelícula, remoción de contaminantes, nitrógeno amoniacal, actividad metabólica, diversidad funcional, TRFLP.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of the C/N ratio on the genetic and metabolic diversity of a microbial community, in the treatment process of two synthetic aquaculture effluents through a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR).

A lab-scale MBBR was continuously operated and fed with two completely soluble and easily biodegradable synthetic effluents, each with two C/N ratios in the feed substrate. The metabolic diversity of the community was measured using Ecoplate® by BIOLOG™. The structure of the community was analyzed by the TRFLP technique, for the 16S, *beta-amoy nirS* genes.

Firstly, the quality of the treated effluent was assured. Ammonia nitrogen and organic matter removal rates were 98% and 82% and above, respectively. The higher the C/N ratio, the higher both ammonia nitrogen, and organic matter removal efficiencies, even though there was no statistically significant difference in the case of the ammonia nitrogen removal efficiency between the different experimental conditions.

It was concluded that both the C/N ratio and the carbon source showed a positive influence on the functional diversity of the biofilm, and on the genetic diversity of the bacterial community. It was also concluded that through the C/N ratio can be controlled the biological processes in the MBBR, depending on the contaminants to be removed from the aquaculture effluent.

**Key words:** biofilm, contaminants removal, ammonia nitrogen, metabolic activity, functional diversity, TRFLP.

## I.-Introducción

Los sistemas acuícolas recirculados (RAS) se diseñaron para producir grandes cantidades de organismos en volúmenes de agua relativamente pequeños (*i.e.* producción intensiva). Sin embargo, la acumulación de residuos de alimento no consumido y la liberación de productos metabólicos residuales, algunos de ellos tóxicos, hace indispensable el tratamiento del agua para su reutilización (Jimenez *et al.*, 2015). El nitrógeno amoniacal es un subproducto de la digestión de las proteínas suministradas en el alimento. Se estima que, por cada 45.75 kilogramos de alimento suministrado, se produce un 1 kilogramos de nitrógeno amoniacal (Masser *et al.*, 1999).

Los reactores de lecho móvil se encuentran entre los biofiltros más utilizados en la remoción de amonio debido a que en el material de empaque se favorece el crecimiento tanto de bacterias autótrofas, que son las encargadas de llevar a cabo el proceso de oxidación del amonio, como heterótrofas (Ebeling *et al.*, 2006). Hay varios estudios donde usan este tipo de reactores para el tratamiento de aguas residuales urbanas con alto contenido de nitrógeno (Abzazou *et al.*, 2016; Bassin *et al.*, 2015; Rejish *et al.*, 2013) y para la remoción de amonio en el tratamiento de efluentes acuícolas (Summerfelt *et al.*, 2015; Terjesen *et al.*, 2013; van Kessel *et al.*, 2010; Rusten *et al.*, 2006).

La oxidación biológica del amonio se lleva a cabo gracias a la transformación de bacterias quimioautótrofas y ocurre en dos pasos: i) el nitrógeno amoniacal es convertido en nitritos mediante las bacterias oxidantes del amonio (AOB por sus siglas en inglés: Ammonia-Oxidizing Bacteria) (*e.g.* *Nitrosomas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*), que obtienen su energía mediante el catabolismo del amonio no ionizado; ii) La oxidación de los nitritos a nitratos ocurre mediante las bacterias oxidantes de los nitritos (NOB por sus siglas en inglés Nitrite-Oxidizing Bacteria) (*e.g.* *Nitobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*). Por otro lado, para llevar a cabo la remoción biológica de nitrógeno se requiere un proceso de reducción de los nitratos, los cuales son convertidos en nitrógeno gas por bacterias heterótrofas. La relación C/N es un factor claves en la estructura de la

comunidad de la biopelícula del biofiltro (Metcalf y Eddy, 2003), las relaciones bajas favorecen la tasa de crecimiento de bacterias autótrofas, mientras que las altas favorece el crecimiento de bacterias heterótrofas (Ebeling *et al.*, 2006).

La estructura de una comunidad microbiana puede ser determinada al definir la capacidad metabólica de los microorganismos (heterótrofos, nitrificantes, desnitrificantes, etc.). Se denomina “grupo funcional” a cada unidad estructural de la comunidad con una función degradativa específica (Hooper y Spehn, 2006). La técnica de Ecoplate de BIOLOG™ ha sido ampliamente usada para estudiar la capacidad degradativa de comunidades bacterianas (Garland, 1997; Weber y Legge, 2010). Ha sido aplicada para evaluar comunidades en el tratamiento de efluentes porcinos (Li *et al.*, 2016), lodos activados (Hashimoto *et al.*, 2014), biofiltros para potabilización (Xiang *et al.*, 2013) y en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (Button *et al.*, 2016; Nivala *et al.*, 2015; Aubron, 2015).

La técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos terminales generados por restricción (T-RFLP, por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism) ha sido utilizada para estudiar las comunidades microbianas complejas sobre la base de la variación en el gen 16S rRNA (Madigan *et al.*, 2009). Se comparan patrones de bandeo para cada grupo de bacterias que contienen algunos genes específicos, para estimar la riqueza y composición de la comunidad, aplicando parámetros de diversidad (Boon *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido ampliamente usada en el estudio de comunidades de suelos (Bustamante *et al.*, 2012; C. Li *et al.*, 2014; Orlando *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2013; Rotthauwe y Witzel, 1997) y aguas (Bassin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se estudió a escala laboratorio, la capacidad degradativa y la estructura de la comunidad de la biopelícula de un reactor de lecho móvil, alimentándolo en forma continua con dos efluentes acuícolas sintéticos, a base de ácido acético y glucosa, con dos relaciones C/N (kgDDO/ kgNH<sub>3</sub>) (C/N = 1 y 10), para cada uno de los sustratos. El objetivo fue analizar la estructura de la comunidad, así como la capacidad degradativa de la comunidad bacteriana, para optimizar la degradación de contaminantes en los RLM y así poder obtener efluentes tratados de mayor calidad, para su reúso en los sistemas RAS.

## II.- Justificación

Conocer la capacidad metabólica y la estructura de la comunidad de la biopelícula en un reactor de lecho móvil para el tratamiento de efluentes acuícolas. proporcionará datos para entender el comportamiento en la remoción de contaminantes nitrogenados y materia orgánica con dos relaciones C/N y dos diferentes efluentes con diferente fuente de carbono para con ello poder definir, cuál de las relaciones C/N hace más eficiente el tratamiento de efluentes acuícolas, proporcionando una mayor calidad en el agua tratada y poder ser reusada en los sistemas acuícolas.

También con este estudio se podrán identificar los factores de operación del RLM clave para la obtención de una mayor calidad de agua al tratar un efluente acuícola y que así los acuicultores tomen en cuenta en su proceso de tratamiento.

Por otra parte, si se obtiene una mayor calidad en el agua tratada, habrá un beneficio económico y social. Por la parte económica si al estanque de cultivo de peces llega agua de buena calidad no pondrá en riesgo de estrés o intoxicación a las especies cultivadas y se obtendrá una mayor producción, lo cual generará mayores ganancias. Por la parte social, al existir una mayor producción estará más accesible para la población, lo cual generará una mayor seguridad alimentaria.

### **III- Marco teórico**

#### **3.1.- La acuicultura**

##### **3.1.1.- Estado actual y problemas ambientales**

La producción acuícola mundial de pescado representó el 44.1 % de la producción total (incluidos los usos no alimenticios) de la pesca de captura y la acuicultura en el 2014, una cifra superior al 42.1 % alcanzando en 2012 y al 31.1 % registrada en 2004 (FAO, 2016).

El estado de las poblaciones de peces marinos en el mundo no ha mejorado, a pesar de haberse realizado progresos notables en algunas áreas, sobre la base del análisis de la FAO de las poblaciones de peces comerciales examinadas, la proporción de poblaciones de peces explotadas a niveles sostenibles desde el punto de vista biológico disminuyó del 90 % en 1974 al 68.6 % en 2013. Así pues, se estima que el 31.4 % de las poblaciones de peces tuvieron un nivel de explotación no sostenible (FAO, 2016).

Lo anterior indica que cada vez más, se está optando por llevar a cabo la práctica de la crianza de recursos acuícolas mediante la acuicultura. Sin embargo, el crecimiento exponencial de la acuicultura ha provocado serias preocupaciones entre los gobiernos, grupos de ambientalistas y la sociedad misma por los posibles daños que estuviera generando sobre el medio, al ser considerada como una actividad en proceso de expansión hay que tener cautela en cómo y dónde se realiza ya que puede degradar la calidad del agua y afectar negativamente a los ecosistemas, tanto en los ríos como en el mar (Bordehore, 2001).

Una estrategia importante en la acuicultura, sobre todo en países desarrollados, donde los costos por el uso del agua son elevados, es la implementación de sistemas de tratamiento y recirculación del agua dentro de las unidades productivas (Ebeling *et al.*, 2006). Los sistemas de recirculación en acuicultura en especial los sistemas acuícolas recirculados (RAS), se diseñan para producir grandes

cantidades de organismos en volúmenes de agua relativamente pequeños. Sin embargo, la acumulación de residuos metabólicos, algunos de ellos tóxicos, hace indispensable el tratamiento del agua para su reutilización (Jiménez *et al.*, 2015).

### **3.1.2.- Acuicultura mediante RAS**

Los métodos convencionales de acuicultura, como los sistemas de estanques al aire libre y los sistemas de malla negra, no serán sostenibles a largo plazo debido a problemas ambientales significativos y su incapacidad para garantizar la seguridad de sus productos al consumidor (Ebeling y Timmons, 2012). Sin embargo, la producción en sistemas RAS es sostenible, puede extenderse fácilmente, es compatible con el medio ambiente ya que utilizan de un 90 a un 99 % de agua menos que los sistemas de acuicultura convencional y tiene la capacidad de garantizar tanto la seguridad como la calidad de las especies cultivadas a lo largo de todo el año (Ebeling y Timmons, 2012).

Los sistemas de recirculación son biológicamente intensos. Los peces suelen ser criados intensivamente (0.06 kilogramos/litro o más) (Masser *et al.*, 1999) para que los sistemas de recirculación sean rentables. Entre los factores de vital importancia que se deben de tomar en cuenta en los sistemas RAS se pueden considerar; caudales uniformes (agua y aire/oxígeno), niveles fijos de agua y operación interrumpida.

Durante las últimas décadas, numerosos diseños de sistemas de recirculación han sido propuestos e investigados (Ebeling y Timmons, 2012). Muchos de estos sistemas iniciales fueron diseñados usando conceptos tradicionales de tratamiento de aguas residuales e ingenierías, o por simple enfoque de ensayo y error. Más recientemente, la ingeniería de la acuicultura ha alcanzado la “mayoría de edad”, y los sistemas han sido diseñados especialmente para acuicultura y las necesidades únicas de un sistema acuático/biológico. Además, se dispone de numerosas fuentes comerciales de equipos y suministros, especialmente diseñadas y comercializadas para la acuicultura.

### 3.1.3.- Estructura de un RAS

La estructura de los RAS está integrada por varios procesos unitarios (Figura 3.1). Existen muchas soluciones para cada una de las operaciones unitarias y aunque algunas se han propuesto de una manera más compleja, eficientes o rentables en comparación a otras, no existe una tecnología correcta o incorrecta. Todos los estudios reportados sugieren que puede ser usada la tecnología propuesta o estudiada, funcionando en cierta medida, algunas funcionan mejor en aplicaciones a gran escala y otras a pequeña escala.

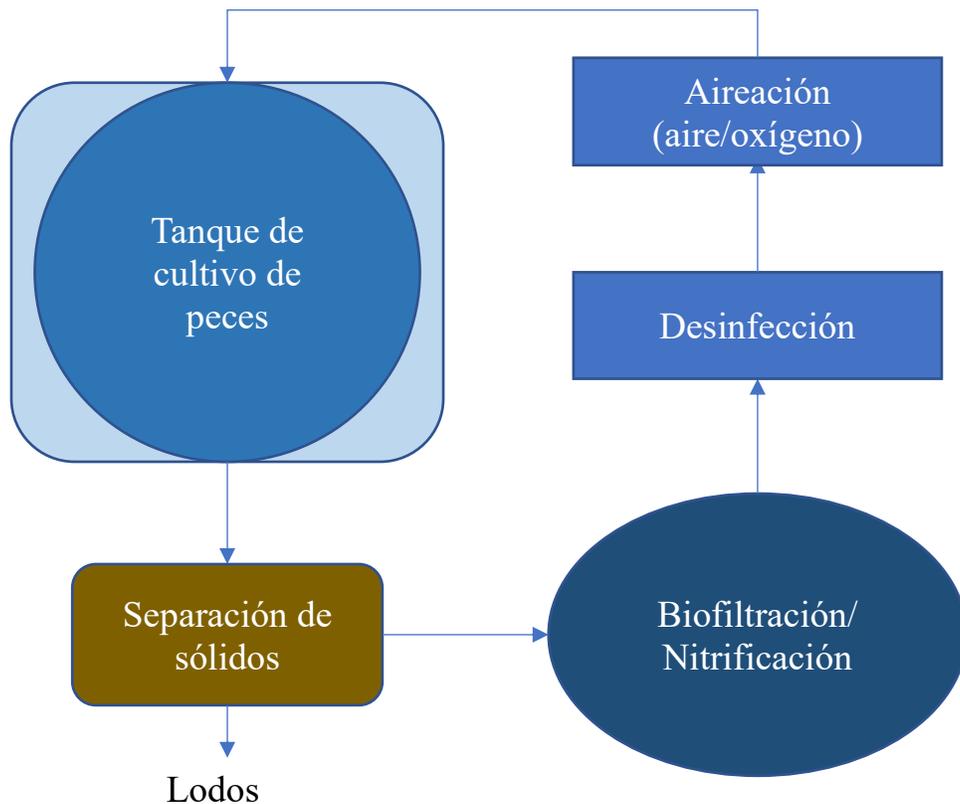


Figura 3.1.- Operaciones unitarias básicas de un RAS. (Adaptado de Timmons et al., 2012)

Cada una de las operaciones unitarias es importante para el proceso, y entre éstas se encuentra el proceso de nitrificación. Para el proceso de nitrificación se utilizan

biofiltros, los cuales tienen la característica de que se adhieren las bacterias a un material de soporte formando biopelículas. Esta biopelícula es la que se encarga de llevar a cabo el proceso de oxidación del amonio. Entre los biofiltros comúnmente usados en este tipo de sistemas se encuentran: filtros percoladores, filtros de lecho flotante, reactores de lecho fluidizado, filtros de flujo descendente, tapetes bacterianos (Jiménez *et al.*, 2015) y reactores de lecho móvil (Ebeling y Timmons, 2012).

En un RAS el agua es desplazada desde el tanque de cultivo de peces y fluye a través del sistema que elimina los sólidos sedimentables, posteriormente el agua pasa a un proceso biológico en el que se convierte el amonio en nitratos y se remueve el carbono, después pasa a un proceso de desinfección y, por último, el agua tratada se oxigena para regresar al tanque de cultivo de peces. Este sistema debe ser monitoreado para asegurar la calidad del agua que está regresando al estanque y así evitar que enfermen y mueran las especies cultivadas (Ebeling y Timmons, 2012).

### **3.2.- RLM como herramienta en el tratamiento de efluentes acuícolas**

#### **3.2.1.- Procesos biológicos de tratamiento de agua en un RAS**

El amonio proviene principalmente de las excretas y de los residuos del alimento suministrado a los peces que no es consumido. Se estima que del 25 al 50 % del alimento suministrado a los peces no es aprovechado, por tanto, la rápida remoción de los residuos sólidos es un punto clave en la acuicultura. Dado que este alimento es una base nutricional (carbohidratos y proteínas) para el crecimiento de microorganismos. Estos residuos deben ser removidos para evitar su descomposición y afectación al sistema de cultivo.

El tratamiento biológico permite, por medio de bacterias, que la materia orgánica nitrogenada que ha sido desechada por los peces sea oxidada hasta nitratos por

bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosomas* (Madigan *et al.*, 2009). Es importante tener en cuenta la concentración de oxígeno disuelto presente en el reactor y la alcalinidad, ya que los procesos biológicos, requiere de cantidades elevadas de oxígeno. Para oxidar un gramo de amonio, se requiere 4.6 g de oxígeno y 7.14 g de alcalinidad medida como carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (Metcalf y Eddy, 2003). La alcalinidad se añade generalmente usando bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) o carbonato de calcio, cal apagada ( $\text{CaO}$ ) o cal hidratada ( $\text{Ca(OH)}_2$ ).

### **3.2.2.- Funcionamiento de un RLM**

Los RLM consisten en un proceso de mezclado completo y flujo continuo que combina lo mejor del crecimiento adherido y biomasa en suspensión (Ødegaard, 1999). El funcionamiento de los reactores de lecho móvil está basado en el crecimiento de la biomasa que forma una biopelícula sobre un medio de soporte plástico que se encuentran en suspensión en el interior de un reactor biológico. La capacidad de remoción de contaminantes va a depender, entre otros factores, de la cantidad de área superficial disponible para la formación de la biopelícula (Ødegaard, 1999) es por esto que uno de los biofiltros más usados en los RAS son los reactores de lecho móvil.

Se considera que su costo de operación es bajo, debido a que no se requiere recirculación de la biomasa, ni tratamiento de ella en periodos cortos de tiempo, así como bajo costo de fabricación (Rusten *et al.*, 2006; Orantes y González-Martínez 2003). Los soportes son movidos mediante un sistema de agitación, generado por la aireación, (Reactores aerobios) o por sistemas de agitación mecánica (Reactores anóxicos o anaerobios) (Figura 3.2).

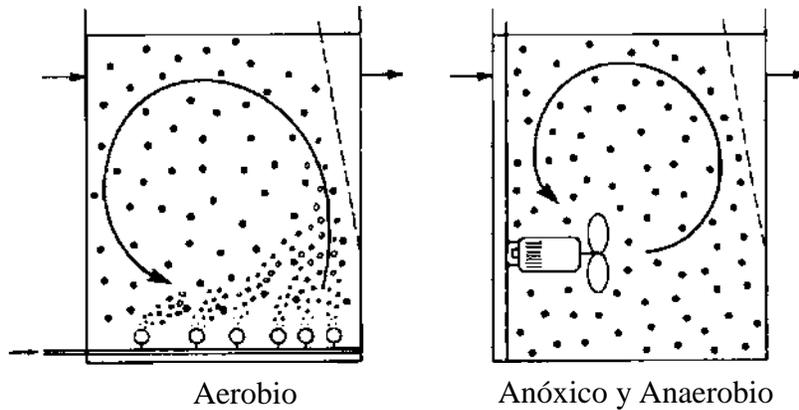


Figura 3.2.- Principio de funcionamiento de los reactores de lecho móvil (Rusten et al., 2006, Ødegaard, 1999).

En el tanque se introducen piezas de plástico con densidades ligeras inferiores a la del agua (e.g.  $0.96 \text{ g/cm}^3$ ) especialmente diseñadas o algún medio plástico de bajo costo, con características adecuadas (Orantes y González Martínez, 2003), particularmente con alta densidad de área superficial (e.g.  $> 500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), que sirva como base para el crecimiento de los microorganismos. El medio más utilizado en los RLM es Kaldnes K1 (Pfeiffer y Wills, 2011). Lo que permite el movimiento continuo del empaque junto con el líquido y los contaminantes es el movimiento que se lleva a cabo gracias a la turbulencia generada por las burbujas de aire. El reactor se empaqueta con un 30 a un 70 % del volumen del reactor, con material de soporte (Metcalf y Eddy, 2003). Se debe de buscar que la turbulencia, sea la adecuada, para evitar el desprendimiento de la biopelícula, la extracción de lodos en exceso se hace a través de un sedimentador, el cual se diseña como un sedimentador primario convencional. Por otro lado, estos reactores permiten la generación de una biomasa característica de cada tipo de reactor (aerobio, anóxico o anaerobio) dando lugar a la obtención de una biopelícula con una elevada actividad. Experimentalmente se ha constatado que las tasas de nitrificación y desnitrificación en este tipo de procesos son superiores a las obtenidas en los procesos convencionales, además de que presentan una recuperación rápida del proceso ante inhibiciones por la formación de una biopelícula estratificada.

### **3.2.3.-Ventajas de los Reactores de lecho móvil (RLM)**

Entre las principales ventajas que presentan los reactores de lecho móvil son:

- ❖ Reducción de volumen de la instalación global en función del área superficial específica del medio de soporte.
- ❖ Son de gran flexibilidad en cuanto al llenado del reactor. Para una operación adecuada del reactor se recomienda un llenado de material de soporte del 30 al 70 %.
- ❖ En este sistema no es necesario un sistema de recirculación.
- ❖ Fácil operación y control del proceso
- ❖ Estos reactores permiten la generación de una biomasa característica de cada tipo de reactor (aerobio, anóxico o anaerobio) dando lugar a la obtención de una biopelícula con una elevada actividad. Experimentalmente se ha constatado que las tasas de nitrificación y desnitrificación en este tipo de procesos son superiores a las obtenidas en los procesos convencionales
- ❖ Recuperación rápida del proceso ante inhibiciones por la formación de una biopelícula estratificada.

### **3.2.4.-Parámetros de diseño y operación**

Para el correcto funcionamiento de los reactores, es importante controlar los parámetros de diseño y operación como: tiempo de retención hidráulico, carga orgánica y tiempo de retención celular (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.- Parámetros de operación para reactores de lecho móvil, usando efluentes acuícolas y acuícolas sintéticos

Parámetro	Formula	Interpretación	Reportados	Referencias
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	$TRH = \frac{V}{Q}$	TRH.- Tiempo de retención hidráulico (h) Q.- Caudal que entra al sistema (m <sup>3</sup> /h) V.- Volumen del reactor (m <sup>3</sup> )	De 5 min a 5 días máximo	(Bassin <i>et al.</i> , 2015; Pfeiffer Wills, 2011; Rusten <i>et al.</i> , 2006; Terjesen <i>et al.</i> , 2013)
Tiempo de retención celular (TRC)	$TRC = \frac{ST_{biop} * A}{S_{ef} * Q}$	$ST_{biop}$ .- Sólidos en la biopelícula (mg/m <sup>2</sup> ) $S_{ef}$ .- Masa de sólidos del efluente (mg/L) A Área del material de soporte (m <sup>2</sup> )	*12 y 13 días, para lograr concentraciones bajas de amonio. *4 a 6 días nitrificación despreciable. *4 a 13 días nitrificación parcial.	(González <i>et al.</i> , 2002; Pfeiffer y Wills, 2011)
Carga hidráulica	$C.H = \frac{Q}{A}$	C.H.- Carga hidráulica (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .d) Q .-Caudal que entra al reactor (m <sup>3</sup> /d) A .-Área específica superficial total del medio de soporte (m <sup>2</sup> )	-	-
Carga Orgánica	$C.O = \frac{cxQ}{A}$	C.O.- Carga Orgánica (gDQO/m <sup>2</sup> .d) Q.-Caudal que entra al reactor (m <sup>3</sup> /d) A .-Área específica superficial total del medio de soporte (m <sup>2</sup> ) cx .-Concentración del sustrato que entra al reactor (gDQO/m <sup>3</sup> )	-	-
Carga Amoniacal	$C.A = \frac{cxQ}{A}$	C.A.- Carga Amoniacal (gN-NH <sub>3</sub> /m <sup>2</sup> .d) Q .-Caudal que entra al reactor (m <sup>3</sup> /d) A .-Área específica superficial total del medio de soporte (m <sup>2</sup> ) cx .-Concentración del sustrato que entra al reactor (g NAT/m <sup>3</sup> )	Se encuentran reportes que van desde los 0 a 1 g NAT/m <sup>2</sup> . d	(Pfeiffer y Wills, 2011; Rusten <i>et al.</i> , 2006; Terjesen <i>et al.</i> , 2013)

Se tienen valores recomendados para los parámetros de diseño de reactores de lecho móvil para el tratamiento de aguas residuales municipales (Tabla 3.2.), sin embargo, para el tratamiento de efluentes acuícolas, no se han estandarizado los valores, ya que los datos reportados, son muy variados, debido a que dependen de los sistemas de cultivo.

*Tabla 3.2.- Parámetros típicos de diseño para reactores de lecho móvil para aguas residuales domésticas (Adaptado de Metcalf y Eddy, 2003).*

PARÁMETROS	RANGO DE VALORES	UNIDAD
TRH anóxico	1.0–2.0	H
TRH aerobio	3.5-4.5	H
Área específica superficial	200-1200	m <sup>2</sup> ·m <sup>-3</sup>
DBO	1.0-1.4	kg·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>
Velocidad de aplicación hidráulica al sedimentador secundario	0.5-0.8	m·h <sup>-1</sup>

### 3.3.- Dinámica de comunidades bacterianas

En los procesos de tratamiento de aguas residuales, las bacterias forman comunidades de suma importancia en la degradación de contaminantes (Manahan, 2007). Las comunidades bacterianas están definidas según Atlas y Corzo, (2002) como un conjunto integrado de poblaciones microbianas que interaccionan entre ellas y coexisten en un espacio determinado, denominado hábitat. En una comunidad, cada microorganismo que ha logrado sobrevivir, desempeña un papel funcional que contribuye al mantenimiento de estas comunidades (Atlas y Corzo, 2002). Las poblaciones de una comunidad que utilizan los mismos recursos muestran a menudo una intensa competencia, donde en alguno de los casos se produce una sucesión de poblaciones, en la cual la mejor adaptada desplazan a las que ocupan el nicho original (Atlas y Corzo, 2002). Las biopelículas son comunidades microbianas complejas que se desarrollan formando una sucesión que se inicia con la colonización de la superficie (Atlas y Corzo, 2002; Madigan *et al.*, 2009). El tiempo en el que se da la fase inicial de la colonización superficial es relativamente corto; puede ser desde unos cuantos minutos en que se puede formar la película molecular y

la colonización bacteriana ya es significativa a las 24 h (Atlas y Corzo, 2002; Characklis *et al.*, 1990).

Esta propiedad que tienen los microorganismos de formar biopelículas, ha sido aprovechada por la biotecnología para ser usada en el tratamiento de aguas residuales, donde se utilizan microorganismos soportados para conseguir una mayor eficiencia de remoción de contaminantes, además de desarrollar procesos de degradación de contaminantes muy específicos, tal es el caso de la remoción de nitrógeno en RLM (Reboleiro *et al.*, 2015).

### **3.3.1.- Composición de la biopelícula**

La composición de la biopelícula está dada por el tipo de efluente que se esté tratando, con base en esto se va a establecer una comunidad endémica que es la que se va encarga de la degradación de los contaminantes (Hashimoto *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Las biopelículas están conformadas principalmente de sustancias poliméricas y bacterias (80-90%), aunque también en menor proporción se encuentran presentes metazoarios y protozoarios (Metcalf y Eddy, 2003).

### **3.3.2.- Remoción biológica de nitrógeno.**

Se han desarrollado diferentes alternativas para la remoción de nitrógeno en las plantas tratadoras de efluentes acuícolas, donde los procesos biológicos de nitrificación bacteriana autotrófica son los más eficientes y económicos (Ebeling *et al.*, 2006). Este proceso es llevado a cabo por un conjunto de especies bacterianas que forman parte del ciclo del nitrógeno (Figura 4.3.2), miembros de la familia *Nitrobacteriasceae*, que son microorganismos aerobios obligados que no tienen capacidad para desarrollarse en los cultivos axénicos convencionales empleados para los microorganismos heterotróficos

(Ornelas *et al.*, 2012) debido a sus requerimientos nutricionales especiales y su lenta velocidad de desarrollo.

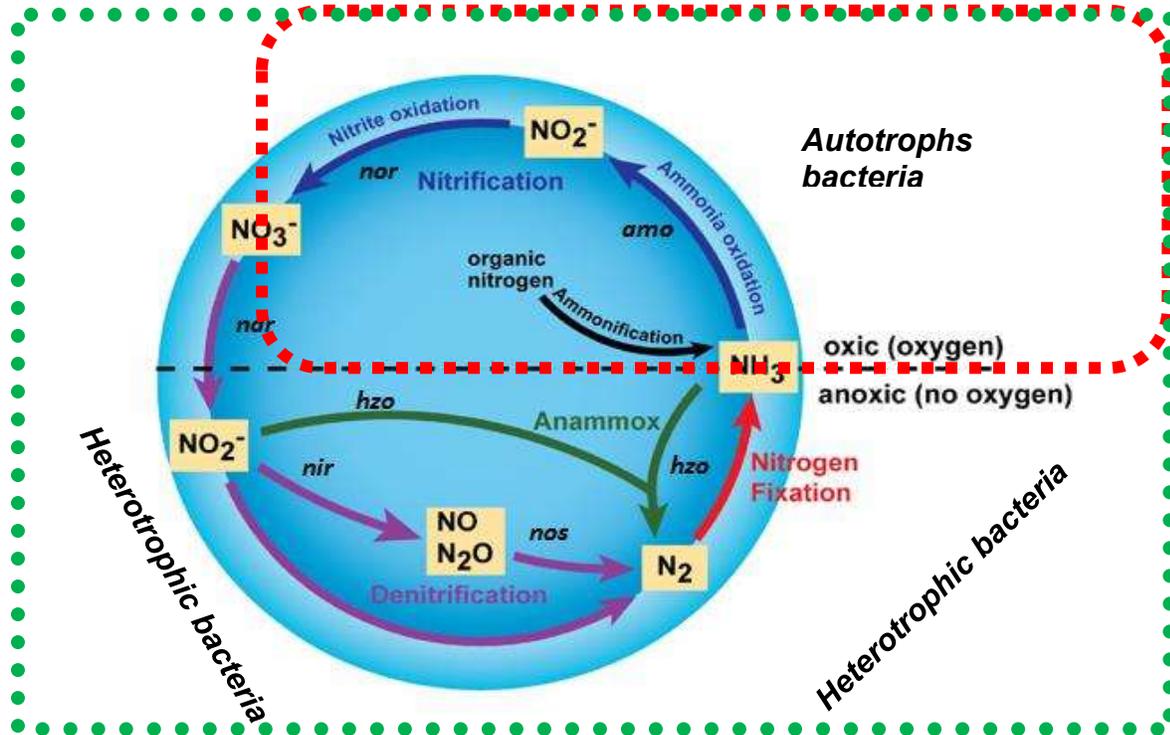


Figura 3.3. Ciclo del nitrógeno en el agua tomado de Nature education (2010), modificado y complementado de (Lüke *et al.*, 2016; Madigan *et al.*, 2009).

### Nitrificación

El proceso de nitrificación biológica ocurre en dos etapas, una es la amonificación aerobia del nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ ) a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), y el otro la oxidación de los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ).

El proceso de nitrificación es generalmente realizado por bacterias quimiolitotóxicas que emplean el carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis celular y el nitrógeno inorgánico para obtener energía (Madigan *et al.*, 2009). Los microorganismos involucrados en este proceso se dividen en dos grupos bien diferenciados (Figura 3.3), las bacterias amonioxidantes (AOB) que se encargan de la conversión del nitrógeno amoniacal en nitritos formando hidroxilamina como producto intermediario en donde

intervienen, los genes *amoC*, *amoA*, *amoB* y *hao*, y las bacterias oxidantes de los nitritos (NOB) que se encargan de la oxidación de los nitritos a nitratos (Timmons *et al.*, 2012), entre los genes más importantes tenemos a *norA* y *norB* (Zehr y Kudela, 2011).

### **Desnitrificación**

El proceso de desnitrificación consiste en la reducción de los nitratos a nitritos y, posteriormente, a compuestos de nitrógeno gaseoso (óxido nítrico NO, óxido nitroso N<sub>2</sub>O y nitrógeno diatómico N<sub>2</sub>) por medio de bacterias heterótrofas, con presencia de genes *narB*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*. La producción energética (ATP) a partir de los nitritos y los nitratos es menor que la obtenida directamente a partir de oxígeno, pero mayor que la obtenida a partir de la reducción de sulfato. Este potencial energético determina la preferencia por parte de los microorganismos de emplear un aceptor de electrones u otro (Brock, 1994). Cuando hay oxígeno, los microorganismos tendrán preferencia hacia éste frente a los nitritos y nitratos, mientras que en ausencia de oxígeno disuelto los microorganismos tendrán preferencia sobre el nitrito y el nitrato antes que sobre el sulfato disponible (Madigan *et al.*, 2009). La utilización de los aceptores de electrones está condicionada a los cambios metabólicos ocurridos en la bacteria, generalmente a nivel de síntesis enzimática. En sistemas de cultivo puro se ha encontrado que el oxígeno es responsable de la supresión de la síntesis de enzimas para el proceso de desnitrificación (Cuervo-López *et al.*, 2009).

Las fuentes de carbono orgánico que pueden servir como sustrato para el proceso de desnitrificación de aguas residuales incluyen compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales urbanas e industriales, o pueden ser compuestos adicionados durante la etapa anóxica como metanol (CH<sub>3</sub>OH), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) ácido acético (CH<sub>3</sub>-COOH), glucosa, entre otros.

### 3.3.3.- Factores que intervienen en la remoción biológica de nitrógeno

Tabla 3.3.- Parámetros fisicoquímicos que intervienen en la remoción de amonio

Factor	Efecto	Optimo	Referencias
<b>Ph</b>	*Efecto en la respuesta de las bacterias  *Cantidad de iones en el medio	7-8	(Ebeling <i>et al.</i> , 2006; Masser, Rakocy y Losordo, 1999; Summerfelt <i>et al.</i> , 2015)
<b>Alcalinidad</b>	*Consumo en la reducción de amonio a nitratos 7.14 g CaCO <sub>3</sub> por cada g de amonio	50- 100 mgL <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	(Ebeling <i>et al.</i> , 2006; Masser <i>et al.</i> , 1999)
<b>Temperatura</b>	*Dinámica de los microorganismos  *Eficiencia de los microorganismos e inhibición	16.1 – 28.3 °C, Rangos de estudio	(Ebeling <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2014)
<b>OD</b>	*Factor limitante, ya que, sin oxígeno disuelto, hay competencia con bacterias heterótrofas.	> 2 mgL <sup>-1</sup>	(Ebeling <i>et al.</i> , 2006; Masser <i>et al.</i> , 1999)
<b>Relación C/N</b>	*Favorece el crecimiento de una comunidad específica en la biopelícula	*0,5 a 8 la fracción de las bacterias nitrificantes disminuye frente a las heterótrofas  *> 5, el proceso puede considerarse una combinación de procesos de oxidación de carbono y nitrificación.  *<0,5, el proceso puede considerarse dedicado exclusivamente a la eliminación de nitrógeno.	(Barajas, 2002)

### **3.3.4.- Identificación de comunidades bacterianas**

Cuando se pretende realizar un análisis microbiano a nivel de comunidad, es muy difícil determinar la estructura de la misma, debido a que esto implica la identificación genética de sus integrantes. Esto implica un gran número de pruebas, tanto bioquímicas como fisiológicas. Este tiempo puede ser tan largo que sobrepase la duración del estudio, o al menos, el tiempo en el cual se puede dar respuesta a un problema determinado (Ramos, 1996). Además, la identificación a nivel de especie no siempre garantiza que una determinada característica, por ejemplo la degradación de sustrato, sea característica de la especie y no de una cepa en particular (Zamora, 2012), por tanto, el análisis metabólico de una comunidad microbiana surge no sólo como una alternativa viable, si no también poderosa, debido a que involucra el atributo funcional de la comunidad (Zamora, 2012).

La estructura funcional de la comunidad se puede considerar como una alternativa para la estimación de la diversidad. Debido a que además de apoyar el desarrollo de la identificación genética, se basa en las características metabólicas de los microorganismos y constituyen una herramienta útil, pues es consecuencia de la diversidad genética taxo-específica de los efectos ambientales sobre la expresión genética y de las interacciones ecológicas con otros taxa (Zak *et al.*, 2014). La diversidad funcional comprende el conjunto de capacidades metabólicas presentes en un ambiente, donde la información no solo repara en taxa y no requiere de conocimientos detallados acerca de la identificación de los microorganismos involucrados, pero expresa su actividad fisiológica dentro del ecosistema (Zamora, 2012), un ecosistema con una alta diversidad funcional opera más eficientemente en términos de productividad, resiliencia y resistencia (Ricotta, 2005).

Esta diversidad funcional resulta muy útil en los casos del estudio de comunidades de microorganismos presentes en un sistema de tratamiento de aguas residuales, donde el interés fundamental es la capacidad de degradación de los contaminantes que pudieran estar presentes en el efluente a tratar. Se han realizado algunos estudios con base en el perfil metabólico de comunidades, en muestras de efluentes de granjas porcinas y

humedales (Li *et al.*, 2016; Nivala *et al.*, 2015), con el fin de mejorar el entendimiento del potencial de degradación de materia orgánica con diferente estructura molecular.

### **3.3.5- Análisis de la diversidad metabólica de la comunidad mediante Biolog Ecoplate**

Una de las herramientas que ha sido de gran importancia para el análisis de las comunidades bacterianas en décadas recientes es el análisis funcional como indicador de la estructura de las comunidades microbianas a través de la utilización de diferentes fuentes de carbono, para poder así establecer su perfil metabólico (Button *et al.*, 2016; Garland, 1997; Weber y Legge, 2010).

El perfil fisiológico a nivel comunidad (CLPP por sus siglas en inglés: Community-Level Physiological Profiling) es una técnica con un protocolo fácil de aplicar, que proporciona una gran cantidad de información referente a la diversidad metabólica de una comunidad determinada. Dos o más comunidades pueden ser comparadas con base en la utilización de diferentes fuentes de carbono (Weber y Legge, 2010) ya que mientras la comunidad tenga la capacidad de degradar un sustrato será útil para el proceso de tratamiento, sin importar que se pudieran llegar a presentar cambios poblacionales en la estructura de la comunidad.

Las microplacas Ecoplate de BIOLOG® constituyen una técnica ampliamente usada (Button *et al.*, 2016; Garland, 1997; Garland *et al.*, 2001; Nivala *et al.*, 2015) para identificar el perfil metabólico de una comunidad. La placa contiene 31 fuentes de carbono con diferente estructura molecular y un blanco, todas por triplicado. Esto hace un total de 96 pocillos que contienen una sal de tetrazolium que funciona como indicador por la oxidación de las moléculas de NADH, producto del metabolismo de la comunidad bacteriana, formando Formazan, un compuesto color violeta, que es cuantificado por medio de un espectrofotómetro a 590 nm.

### **3.3.6- Estructura genética de la comunidad a través del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales (TRFLP)**

Los métodos de detección de huellas genéticas basadas en el estudio del material genético (ADN ó ARN), permiten conocer un perfil representativo de la estructura poblacional en una comunidad bacteriana asociada a determinado hábitat, que incluye tanto las poblaciones cultivables como las no cultivables (Muyzer *et al.* 1993, Huber *et al.* 2004). Las técnicas moleculares asociadas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: polymerase chain reaction) han permitido el estudio de la composición de comunidades bacterianas en diferentes muestras. La identificación se realiza a partir de un templado de ADN de la comunidad el cual es amplificado por PCR (Liu *et al.*, 1997) que posteriormente es tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Estas enzimas de restricción hacen un proceso de digestión restrictiva en el cual reconocen secuencias cortas y específicas en el ADN que cortan, dejando fragmentos de distintas longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular debido a la diferencia en las secuencias del ADN en los individuos donde los sitios de restricción varían

## **IV.- Marco conceptual de la investigación**

### **4.1.- Hipótesis**

Al incrementar la relación C/N de alimentación de un reactor de lecho móvil, para el tratamiento de efluentes acuícolas, aumentará la diversidad metabólica y se modificará la estructura de la comunidad de la biopelícula.

### **4.2.- Objetivo**

#### ***4.2.1.- Objetivo general***

Analizar los cambios en la diversidad metabólica y la estructura de la comunidad bacteriana en la biopelícula de un reactor de lecho móvil, para el tratamiento de un efluente acuícola sintético, con el incremento de la relación C/N.

#### ***4.2.2.- Objetivos específicos***

- a) Evaluar la eficiencia de remoción de contaminantes en el biorreactor, alimentado con dos relaciones C/N y con los dos efluentes tratados.
- b) Comparar el perfil metabólico de la comunidad bacteriana de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con cada relación C/N y con los dos efluentes tratados.
- c) Comparar la estructura de la comunidad bacteriana en la biopelícula del reactor de lecho móvil, alimentado con dos relaciones C/N y con los dos efluentes tratados.
- d) Determinar cómo influyen los parámetros operacionales del biorreactor, en el perfil metabólico de la comunidad bacteriana de la biopelícula.
- e) Determinar cómo influyen los parámetros operacionales del biorreactor, en la estructura de la comunidad bacteriana de la biopelícula.

## **V.- Materiales y Métodos**

### **5.1.- Plan experimental**

Se trabajó con un diseño experimental  $2^2$ , con dos efluentes acuícolas sintéticos y con dos relaciones C/N (en términos de relación kgDQO/kgN-NH<sub>3</sub>) para cada efluente. Las relaciones C/N a las cuales se trabajó fueron de 1 y 10. La Carga Amoniaca (CA) teórica trabajada en el reactor fue de 0.11 gN-NH<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>d. La carga orgánica teórica trabajada en el reactor fue de 0.11 y 1.13 g/m<sup>2</sup>d para las relaciones C/N de 1 y 10 (kgDQO/kgN-NH<sub>3</sub>) respectivamente.

### **5.2.- Preparación del efluente acuícola sintético**

Se preparó el efluente acuícola sintético, con una relación C/N (DQO/N-NH<sub>3</sub>) de 1 y 10. Para ajustar la DQO se adicionó ácido acético (85 %, Golden Bell®) ó D-Glucosa (MEYER®) y para ajustar el N-NH<sub>3</sub> a una concentración de (17 mg N-NH<sub>3</sub>/L) se llevó a cabo con nitrato de amonio (Meyer®) y fosfato de amonio (Labessa®).

La preparación del sustrato se realizó cada 5 días en un bidón con capacidad de 200 L manteniendo la solución en agitación constante.

### **5.3.- Descripción del RLM**

Se trabajó con un reactor de lecho móvil a escala laboratorio, cilíndrico con fondo en forma de un cono truncado, con un volumen útil de 40 L. El diámetro en la parte superior fue de 0.5 m, en el fondo del cono trunco se colocó un difusor de aire circular ( $\varnothing_d = 25$  cm), con membrana, de burbuja fina ( $\varnothing_b \leq 2$  mm), que se encargó de proporcionar la aireación y agitación al reactor (Figura 5.1). El Influyente con un caudal de 1.7 L/h fue bombeado dentro del RLM. El efluente salió del reactor por gravedad con apoyo de un canal de sección semicircular, ranurado en la mitad superior del perímetro.



*Figura 5.1.- Reactor de lecho móvil piloto, con volumen útil de 40 L*

El material de soporte usado en el reactor de lecho móvil fue Kaldnes® K1, con densidad específica de  $0.96 \text{ g/cm}^3$  y densidad de área superficial de  $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Sus medidas son 7.1 mm de longitud, 9.1 mm de diámetro. Se trabajó con un volumen aparente de llenado del 30 % con respecto al volumen útil del reactor.

#### **5.4.- Inoculación del RLM**

Para la inoculación del RLM se usó biopelícula soportada del reactor del RAS del laboratorio de Biología Acuática, de la Facultad de Biología de la UMSNH. Se realizó una etapa de adaptación, que consistió en alimentar al reactor con una solución de ácido acético (85 %, grado técnico, Golden Bell®), nitrato de amonio (grado técnico, Meyer®) y fosfato de amonio (grado técnico, Labessa®). Esto se llevó a cabo durante 6 días, alimentando con relaciones de C/N ( $\text{kgDQO}/\text{kgN-NH}_3$ ) de 10, 5 y 1 ( $\text{kgDQO}/\text{kgN-NH}_3$ ).

#### **5.5.- Operación y medición de parámetros**

El reactor se dejó estabilizar por un periodo de 12 semanas alimentándolo con el efluente acuícola sintético con la relación C/N de  $1 \text{ kgDQO}/\text{kgN-NH}_3$ . Después de la adaptación,

se realizó un seguimiento del reactor estabilizado con esta relación C/N durante dos semanas y posteriormente se realizó el cambio de relación C/N de 1 kgDQO/kgN-NH<sub>3</sub> a 10 kgDQO/kgN-NH<sub>3</sub>, con un tiempo de adaptación de dos semanas más entre ambas condiciones experimentales, para realizar las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos y de diversidad metabólica y genética. Este procedimiento se repitió con el segundo sustrato, incluyendo las dos semanas de adaptación entre ambos sustratos. Los parámetros de diseño teóricos del reactor se muestran en la tabla 5.1.

Las condiciones experimentales no fueron controladas, es decir no se controló ni la temperatura, ni el pH. Únicamente se llevó un control, tomando lecturas constantes conforme a las metodologías citadas en la tabla 5.2.

Los parámetros de diseño teóricos del reactor se muestran en la tabla 5.1

*Tabla 5.1.- Parámetros de diseño del reactor de lecho móvil*

Parámetro	Valor	Unidad
TRH	24	h
V reactor	40	L
V llenado	30	%
Q	40	Ld <sup>-1</sup>

### **5.6.- Análisis de muestras**

Se tomaron muestras en 4 puntos, que fueron; el efluente, el influente, el reactor y la biopelícula soportada. Los análisis fisicoquímicos se realizaron según diferentes metodologías (Tabla 5.2). Se realizaron mediciones cada 15 días, hasta la estabilización del reactor y posteriormente de manera semanal, junto con la toma de la muestra de los puntos anteriores, también se tomó muestra de la biopelícula para el análisis del perfil metabólico de la comunidad del reactor y la Estructura de la comunidad.

Tabla 5.2.- Parámetros determinados y metodologías usada

Parámetro	Afluente	Reactor	Efluente	Biopelícula	Método
SST (mg/L)	✓		✓		Método por gravimetría (Métodos estandarizados) <sup>a</sup>
SSV (mg/L)	✓		✓		Método por gravimetría (Métodos estandarizados) <sup>a</sup>
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)			✓		Método de reducción con cadmio <sup>b</sup>
N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	✓		✓		Método del salicilato <sup>b</sup>
PH			✓		Thermo Scientific, Orion Star AZ11 potenciometro.
DQO <sub>T</sub> (mg/L)	✓		✓		Método de digestión en reactor y colorimetría, espectrofotómetro DR800, Hach (0-1,500 mg/L).
Temperatura (°C)			✓		NMX-AA-007-SCFI-2013
OD (mg/L)			✓		Sonda para determinación de oxígeno disuelto YSI125 modelo: 55-25 FT
DQO <sub>s</sub> (mg/L)			✓		Método de digestión en reactor y colorimetría, espectrofotómetro DR800, Hach (0-1,500 mg/L).
Perfil metabólico				✓	Ecoplate BIOLOG ®
SV (mg/L)				✓	Método por gravimetría (Métodos estandarizados) <sup>a</sup>
ST (mg/L)				✓	Método por gravimetría (Métodos estandarizados) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>(APHA, 1992), <sup>b</sup>Espectrofotómetro DR2800 Hach Co.Colorado, US

Los análisis en la biopelícula, tanto para sólidos, como para el análisis del perfil metabólico y Estructura de la comunidad de las comunidades bacterias se describe a continuación: la toma de muestras se hizo en el periodo estable durante 3 semanas consecutivas para cada relación C/N con cada uno de los sustratos, asignándoles un código (Tabla 5.3).

Tabla 5.3.- Código de las muestras que se trabajaron con los dos sustratos y las dos relaciones C/N

Relación C/N	Semana	Efluente acuícola 1	Efluente acuícola 2
<b>1</b>	1	1AA1	1G1
	2	1AA2	1G2
	3	1AA31	1G3
<b>10</b>	1	10AA1	10G1
	2	10AA2	10G2
	3	10AA3	10G3

### 5.7.- Desprendimiento de la biopelícula

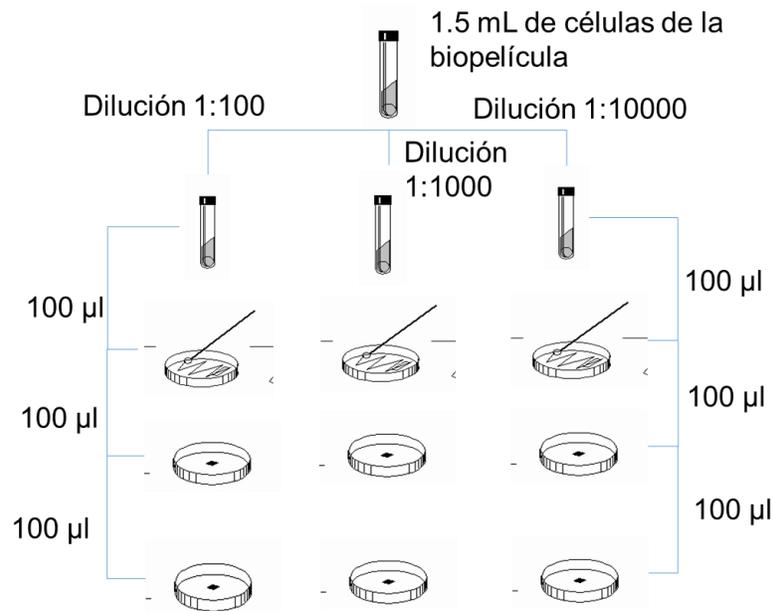
Para los análisis de sólidos totales y volátiles en la biopelícula, así como para el análisis del perfil metabólico, se desprendió la biopelícula del material de soporte. Se colocaron muestras de 25 piezas de kaldnes del RLM, tomada al azar en un vaso estéril con 45 mL de solución buffer de fosfatos ([pH 7,0], 0.1 M) estéril. Se sónico la muestra por 20 min en un Sonicador Branson modelo 2510.

### 5.8.- Análisis del perfil metabólico (CLPP) de las comunidades bacterianas

Uno de los objetivos principales de la ecología microbiana para entender el papel de los microorganismos en el ambiente, es comprender los procesos metabólicos que realizan éstos (Characklis *et al.*, 1990). Un acercamiento a esta problemática fue realizado con la evaluación del perfil metabólico de la comunidad en la biopelícula. Este tipo de estudio se espera que sólo detecte cambios drásticos en la comunidad microbiana de la biopelícula, tal es el caso del cambio de relación C/N.

El perfil metabólico de la comunidad fue evaluado mediante las placas Ecoplate™ de BIOLOG. Después de haber desprendido la biopelícula del material de soporte (*c.f.* subcap 5.7), se colocó la muestra en agitación durante 45 min. Se dejó reposar durante 30 min con la finalidad de que sedimente material de la biopelícula que no son bacterias (EPS, arenas etc). Se tomaron 7.5 mL de la muestra, se colocaron en 5 tubos de

microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugaron por 10 min a 4 g. Se realizaron 4 diluciones (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) en solución buffer de fosfatos ([pH 7,0], 0.1 M) estéril. Se sembraron las últimas tres diluciones en agar de soya tripticaseina (AST) por triplicado con la técnica de expansión con varilla (Figura 5.2). Se incubaron por 24 h a temperatura ambiente. Se realizó una cuenta viable para determinar las UFC/mL contenidas en la muestra. Se realizó una dilución de la muestra original en solución buffer de fosfatos ([pH 7,0], 0.1 M) estéril, con la finalidad de inocular 5000 UFC/mL en las Ecoplate™.



*Figura 5.2- Dilución de la biopelícula y siembra en agar de soya tripticaseinaa para estandarizar el volumen inoculado en las placas Biolog Ecoplate™*

De la solución anterior se inocularon 150 µL en cada uno de los pozos de la placa Ecoplate™. Se tomó lectura de la placa en el T0 y posteriormente cada 12 h en la estación MICROLOG™ a 590 nm. Las placas fueron inoculadas a temperatura ambiente. La absorbancia evaluada para cada uno de los 31 sustratos fue corregida por la resta del blanco control y la lectura del tiempo 0 (Weber y Legge, 2010).

La observación del Promedio de Desarrollo del Color del Pozo (AWCD por sus siglas en inglés: Average Well Color Development), se realizó para conocer el comportamiento del aprovechamiento de los sustratos a través del tiempo. Para evaluarlo se eligieron 3 puntos en las cinéticas, correspondientes a las horas 24, 64 y 120. Fueron elegidas de esa manera, dado que a la hora 24 es cuando en la mayoría de las cinéticas empezó la fase exponencial, a la hora 64 todas las cinéticas se encontraban en fase exponencial (Garland, 1997; Weber y Legge, 2010) y a la hora 120, se encontraban en fase estable. Se determinó la diversidad de consumo de sustratos por la comunidad de la biopelícula, se calculó la riqueza (número de sustratos metabolizados), la abundancia (Abs medida en cada uno de los pozos) y la diversidad (índice de Shannon) (Tabla 5.4). Los índices de diversidad son muy usados en ecología como una medida de evaluación de la diversidad de los sitios. En el presente trabajo se utilizó el índice de Shannon y equitatividad de Shannon para comparar la capacidad de degradación de los sustratos en la placa, por la comunidad de la biopelícula del RLM.

Tabla 5.4.- Fórmulas para calcular los índices de diversidad metabólica

índice	Definición	Formula	Significado
<b>AWCD</b>		$AWCD = \frac{1}{31} \sum (A_i - A_0)$	Ai= Absorbancia medida en el pozo i y Ao representa la absorbancia del blanco
<b>Índice de Shannon</b>	Estima el grado de incertidumbre	$H = \sum p_i (\ln p_i)$	H= índice de diversidad de Shannon  Pi= proporcional al desarrollo del color (Absorbancia) en cada pocillo entre el total de pocillos (Absorbancia total)
<b>índice de Equidad o Equitatividad de Shannon</b>	Estima la equidad en las proporciones encontradas de cada producto en la comunidad	$E = \frac{H}{\ln S}$	S=Riqueza= Número de pocillos con desarrollo de color (Sustrato utilizado)

Los 31 sustratos contenidos en las Ecoplate se categorizaron en 5 grupos, que fueron; carbohidratos, polímeros, aminoácidos, ácidos carboxílicos y aminos/amidas (Gryta y Oszust, 2014). Se evaluó la dinámica de degradación de los grupos, a la hora 24, 64 y 120 con cada una de las condiciones experimentales.

### **5.10.- Análisis estadístico del perfil metabólico**

Como análisis exploratorios del comportamiento metabólico de la comunidad, se realizó un Análisis de Componente Principales (PCA por sus siglas en inglés) usando una matriz de covarianza de la media ( $n=3$ ) de los datos de las réplicas del patrón de utilización de fuentes de carbono (CSUPs por sus siglas en inglés), con base en los 5 grupos (Carbohidratos, polímeros, ácidos carboxílicos y cetónicos, aminos y amidas y aminoácidos) en los que se clasificaron los sustratos en las tres horas evaluadas de acuerdo con las recomendaciones de Weber y Legger, (2010).

El índice de Shannon puede ser evaluado de manera estadística mediante la prueba de t modificada por Hutchenson, cuando se quiere comparar únicamente dos comunidades (Moreno, 2001). Por tanto, en el presente trabajo se evaluó la diferencia estadística mediante esta prueba.

Los índices de diversidad beta son usados para conocer el cambio de una comunidad con respecto a un gradiente ambiental, a diferencia de la diversidad alfa o gama, que son medidas fácilmente en función del número de especies. La diversidad beta está basada en la diferencias o proporciones de una comunidad con respecto al gradiente ambiental (Moreno, 2001). En este trabajo se evaluó la similitud que existió entre la comunidad del RLM en cada una de las condiciones experimentales mediante el uso el índice de Bray-Curtis (Moreno, 2001).

Los análisis de correlación canónica (CCA por sus siglas en inglés) tienen la finalidad de buscar la relación que existe entre dos o más tipos de variables y la validez de las mismas. En el presente estudio se realizó un CCA con el objetivo de encontrar la relación entre los dos conjuntos de variables; degradación por grupos de sustratos en la placa de

Ecoplate™ (Carbohidratos, Polímeros, Ácidos carboxílicos, aminoácidos y aminas/amidas) y las variables de operación del reactor (DQO, N-NH<sub>3</sub>, SSV, T y pH).

Para conocer el efecto de la relación C/N sobre los resultados obtenidos, se evaluaron estadísticamente tanto los parámetros fisicoquímicos como los metabólicos, mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, complementando con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Los análisis de PCA y CCA se corrieron con PAST 3.0, mientras que las pruebas de ANOVA y Tukey se hicieron en JMP v. 6.0 (SAS, 2005).

## **5.9.- Estructura de la comunidad**

### **5.9.1.- Extracción de DNA**

Se transfirieron 4.5 mL por partes de la biomasa desprendida de la biopelícula como se describe previamente (Sub-capítulo 5.8) a un tubo de 1.5 mL y centrifugo por 5 minutos a 4 g. Se desechó el sobrenadante, y se añadió 1mL de solución TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA; 100mM NaCl). Se agitó en un vortex hasta disolver la pastilla. Se centrifugó 5 min a 4 g. Se agregaron 200 µL de solución TE y se disolvió la pastilla agitando en el vortex. Se centrifugó durante 2 minutos a 4 g y se agregaron 250 µL de solución amortiguadora (40mM Tris pH 7.8; 20mM, acetato de sodio; 1mM EDTA; 1% SDS). Se añadieron 66 µL de solución de NaCl 5 M y se mezcló bien la muestra por inversión. Posteriormente se calentó la muestra por 10 min. a 65 °C. Después se centrifugó la muestra a 6 g por 10 min. y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1 (v/v) y posteriormente se agitó el tubo en el vortex. Se centrifugó la muestra durante 10 min. a 6 g, se tomó la fase acuosa (de arriba) sin romper la interfase. Se agregó 0.6 mL de isopropanol y se agitó manualmente por inversión (20 veces). Se centrifugó la muestra por 10 min. a 6 g, se retiró el sobrenadante con mucho cuidado. Posteriormente se agregaron 400 µL de alcohol etílico al 70%, se agitó en el vortex hasta que la pastilla se levantó. Se centrifugó por 10 min. a 6 g. Después se tiró el sobrenadante sin llevarse la pastilla y se dejó secar. Se disolvió la pastilla en 50 µL de agua destilada libre de endonucleasas.

### 5.9.2.- Amplificación por PCR

El gen que codifica el rRNA ribosomal 16S se usó para estimar la diversidad de la comunidad bacteriana en la biopelícula del RLM. Para la amplificación de este gen, se usaron los oligonucleótidos fD1 y rP2 (Tabla 5.5). La mezcla de reacción para el ensayo de PCR contenía ambos oligonucleótidos a una concentración de 200 nM, se usó GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA polimerasa en 1X Green GoTaq® en amortiguador, buffer [Ph8.5], 200 µM de cada NTP (Nucleósido Trifosfato) y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Promega, WI, USA) y amplificado en un termociclador Maxygene (Axigen, CA, USA), con un volumen final de 50 µL.

Tabla 5.5 – Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los genes.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3') <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Tamaño <sup>c</sup>	Referencias
<b>rDNA 16S</b>	fD1*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	1504	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1492- 1512		
<b>β-amo</b>	β- amof*	TGGGGRATAACGCAYCGAAAG	141-161	1179	(McCaig, 1994)
	β-amor	AGACTCCGATCCGGACTACG	1301- 1320		
<b>NirS</b>	NirS1F	CCTA(C/T)TGGCCGCCRCART	763–780	980	(Braker y Fesefeldt, 1998)
	NirS5R	CGTTGAACTTRCCGGT	1638–1653		
	Cd3AF*	G TSAACG TSAAGGARACSGG	916-935	425	
R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	1322- 1341			

<sup>a</sup>R(A/G)

<sup>b</sup>Las posiciones son indicadas para el gen rDNA 16 S de *Escherichia coli* (AkiC000091), el gen *nirS* de *pseudomonas stutzeri* ZoBell (X56813) y para el gen *β-amo* con *Escherichia coli*.

<sup>c</sup>El tamaño esta dado en pares de bases.

\* Oligonucleótidos marcado con 6-FAM (6-Carboxifluoresceína)

El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 segundos a 57 °C y 2 min a 72 °C, con una extensión final de 20 min a 72 °C.

El gen *beta-amo* que codifica para la enzima amonio monoxigenasa se utilizó como oligonucleótido molecular de las bacterias encargadas de oxidar el amonio, se amplificó usando una estrategia de PCR anidado. Para la primera reacción se usaron oligonucleótidos universales fD1 y rP2 a una concentración de 200 Nm. En la segunda reacción se usaron los oligonucleótidos para el gen *beta-amo* que fueron el *beta-amoF* y *beta-amoR* (Bustamante *et al.*, 2012), información en la tabla 5.5 La mezcla de reacción se preparó de la misma manera que para el gen *16S*. La primera reacción se realizó en las condiciones descritas anteriormente (gen *16S*). Para la segunda reacción el programa de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos los cuales constaron de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 57 °C, 1 min 30 seg a 72 °C y una extensión final de 20 min a 72 °C.

Para el gen *nirS* que codifica la enzima nitrato reductasa se utilizó como oligonucleótidos de las bacterias encargadas de llevar a cabo la desnitrificación. Para la amplificación se siguió la estrategia de un PCR anidado, en la primera reacción, se usaron el par de oligonucleótidos *nirS1F/6R*, para la segunda reacción se usaron los oligonucleótidos *Cd3AF* y *R3cd* (Tabla 5.5) La mezcla de reacción se realizó de la misma manera que para el gen *16S*. El programa usado para amplificar la primera reacción consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos en los cuales en los primeros 10 fueron de 30 s a 95 °C aplicando un touchdown de 45 decreciendo 0.5 °C hasta 40 °C, seguido de una extensión de 40 segundos a 72 °C. Los siguientes 20 ciclos fueron 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 43°C, seguido de 40 segundos a 72°C, para finalizar con una extensión de 7 min a 72 °C (Braker y Fesefeldt, 1998). El programa de amplificación de la segunda reacción consistió en una etapa inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos los cuales constaron de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 20 min a 72 °C.

La integridad de los amplicones se determinó electroforéticamente, mediante geles de agarosa al 1.2 % (p/v) teñidos con GelRed<sup>MT</sup> (Biotium). Los amplicones de los tres genes se purificaron mediante el kit UltraClean PCR Clean-up (MoBio Lab. inc.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

### **5.9.3,- T-RFLP**

Los productos de PCR purificados (250 ng) de los tres genes se digirieron en reacciones separadas con 20 U de enzimas de restricción *HhaI* y *HaeIII* (Thermo Scientific®). Los fragmentos de digestión se purificaron por precipitación alcohólica. Posteriormente los productos se resuspendieron en buffer TE. Los fragmentos de restricción terminal (T-RFs por sus siglas en inglés, terminal restriction fragment) se separaron en un Analizador Genético ABI3730XL (Applied Biosystems, Macrogen Inc., en Corea del Sur). La longitud de los T-RFs marcados fluorescentemente se determinaron por comparación con el estándar de tamaño GeneScan<sup>TM</sup> 1200 LIZ<sup>®</sup> con el software GeneScan 3.71 (Applied Biosystems, Macrogen Inc., en Corea del Sur).

Los picos con una fluorescencia superior a 30 U y superior a 30 pb se analizaron con base en la altura del pico. Los patrones de diferentes muestras se normalizaron a unidades de fluorescencia total idénticas mediante un procedimiento de normalización iterativo. La abundancia relativa de TRFs, como porcentaje, se calculó con la relación entre la altura de un pico dado y la altura de los picos total normalizada de cada muestra. El índice de Shannon ( $H'$ ) se calculó para cada muestra por medio del software PAST (disponible en: <http://nhm2.uio.no/norlex/past/download.html>).

### **5.10.- Análisis estadístico para la estructura de la comunidad**

Con el objetivo de encontrar la relación entre los dos conjuntos de variables; Estructura de la comunidad con base en los TRF's y las variables correspondientes a las variables fisicoquímicas del reactor (DQO, N-NH<sub>3</sub>, SSV, T y pH) se efectuó un análisis de

correlación canónica identificando los posibles efectos sobre las diferencias encontradas en cada relación C/N con los diferentes efluentes sintéticos en el RLM.

Al igual que en la diversidad metabólica se evaluó el índice de Shannon mediante la prueba t de Hutchenson y se obtuvieron dendrogramas con base en la diversidad beta (índice de Bray-Curtis) para conocer las diferencias presentadas en la comunidad bacteriana en los diferentes tiempos evaluados con las diferentes condiciones experimentales.

Para conocer el efecto de la relación C/N sobre los resultados obtenidos, se evaluó estadísticamente tanto los parámetros fisicoquímicos como los de estructura de la comunidad mediante ANOVA de dos vías, complementando con pruebas de Tukey.

Los análisis de PCA, CCA se corrieron por medio del software PAST 3.0 mientras que las pruebas de ANOVA y Tukey se hicieron en JMP v. 6.0 (SAS, 2005).

Los análisis estadísticos anteriores se realizaron para cada uno de los genes estudiados.

## VI.- Resultados

### 6.1.- Seguimiento de parámetros fisicoquímicos del reactor

#### 6.1.1.- Temperatura y pH.

Los parámetros fisicoquímicos monitoreados en el RLM se presentan en la tabla (Tabla 6.1). El oxígeno disuelto se mantuvo en una concentración  $> 2$  mg/L durante toda la fase experimental, condición mínima necesaria para que se pueda llevar a cabo tanto la oxidación de la materia orgánica, como del amonio.

Tabla 6.1.- Parámetros de operación del reactor de lecho móvil a las diferentes relaciones C/N con cada uno de los efluentes acuícolas ( $n=9$ ) (media  $\pm$  Desviación estándar).

Muestras	Efluente acuícola 1		Efluente acuícola 2	
	1AA	10 AA	1G	10 G
T (°C)	19.82 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	17.30 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	17.30 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	16.78 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
pH	8.59 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.47 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>	8.38 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>	8.23 $\pm$ 0.054 <sup>c</sup>

Nota: Los valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

La fase experimental se corrió entre los meses de agosto y febrero. Se tuvo una temperatura entre 16.5 y 20.5 °C. La más alta fue con el efluente 1AA y la menor con el efluente 10G, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0008$ ) entre cada una de las condiciones experimentales trabajadas. La desviación estándar mostrada en cada condición experimental trabajada no fue mayor a 0.67 °C.

Durante la fase experimental, se observó que el pH se mantuvo constante (Tabla 6.1) con cada una de las relaciones C/N, sin embargo, el comportamiento entre las diferentes relaciones C/N si mostró una variación estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ).

### 6.1.2.- Remoción de nitrógeno amoniacal y DQO.

En la tabla 6.2 se muestran las concentraciones de nitrógeno amoniacal en la entrada y salida del reactor, así como las del nitrógeno de nitratos.

Tabla 6.2- Concentraciones de DQO, N-NH<sub>3</sub> y N-NO<sub>4</sub> en la entrada y salida del reactor (media  $\pm$  Desviación Estándar, n=3)

Muestras	Efluente acuícola				Efluente del reactor			
	1AA	10 AA	1G	10G	1AA	10 AA	1G	10G
<b>DQO</b>	17.66 $\pm$	170.66 $\pm$	15.66 $\pm$	161.66 $\pm$	2.67 $\pm$	11.67 $\pm$	1.33 $\pm$	7.66 $\pm$
<b>(mg/L)</b>	1.15	5.77	0.57	1.52	1.15	7.76	0.57	1.52
<b>N-NH<sub>3</sub></b>	16.93 $\pm$	17.16 $\pm$	16.16 $\pm$	16.2 $\pm$	0.19 $\pm$	0.35 $\pm$	0.213 $\pm$	0.25 $\pm$
<b>(mg/L)</b>	1.62	1.47	0.55	0.55	0.14	0.035	0.005	0.04
<b>N-NO<sub>4</sub></b>	20.5 $\pm$	21.63 $\pm$	14.3 $\pm$	19.16 $\pm$	36.43 $\pm$	34.83 $\pm$	25.66 $\pm$	32.5 $\pm$
<b>(mg/L)</b>	1.77	1.06	0.43	0.43	3.15	1.45	6.76	8.52

El porcentaje de amonio removido en términos de CA (Carga amoniacal) en la fase estable de cada una de las relaciones C/N con los dos efluentes acuícolas sintéticos, se evaluó para cada relación C/N, así como para los sustratos. Se encontró que la relación C/N, si presentó un efecto estadísticamente significativo con respecto a la remoción de CA ( $p=0.0192$ ) entre cada efluente evaluado. Sin embargo, no se observó ningún efecto para los efluentes evaluados ( $p=0.1837$ ). El mayor porcentaje de remoción se obtuvo cuando se trabajó con el efluente 1G, mientras que la menor remoción fue cuando se trabajó con el efluente 10AA (Tabla 6.3).

Tabla 6.3.- Porcientos de remoción de CA (Carga Amoniaca) sin diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.0647$ ) y CO (Carga Orgánica) con diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.0371^*$ ) para cada una de las condiciones experimentales (media  $\pm$  Desviación Estándar,  $n=3$ ).

Muestras	Efluente acuícola 1		Efluente acuícola 2	
	1AA	10 AA	1G	10 G
% Remoción de CA	98.823 $\pm$ 0.473 <sup>a</sup>	98.00 $\pm$ 0.482 <sup>a</sup>	99.07 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>	98.46 $\pm$ 0.501 <sup>a</sup>
% Remoción de CO	82.755 $\pm$ 6.789 <sup>b</sup>	93.304 $\pm$ 4.459 <sup>ab</sup>	91.41 $\pm$ 3.129 <sup>ab</sup>	95.268 $\pm$ 0.932 <sup>a</sup>

La materia orgánica removida del efluente acuícola, medida como DQO a la salida del RLM con cada una de las condiciones experimentales, mostro tener un efecto significativo para las relaciones C/N ( $p=0.0107$ ). El mayor porcentaje de remoción en términos de CO (Carga Orgánica), se obtuvo cuando se trabajó con la condición 10G, presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0371$ ). Cabe destacar que en la remoción de los contaminantes de interés (CA y CO) el efluente evaluado no presento diferencia estadísticamente significativa (Tabla 6.4). Sin embargo, la relación C/N, si mostró tener diferencia estadística.

*Tabla 6.4.- Resumen del ANOVA de dos vías comparando las condiciones experimentales, correspondientes a las remociones de contaminantes, y parámetros de respuesta del RLM*

<b>Respuesta del RLM</b>	<b>R</b>	<b>p (ANOVA)</b>	<b>p (Efluente)</b>	<b>p (C/N)</b>	<b>Efluente *C/N</b>
% remoción de carga amoniacal	0.58	0.0647	0.1837	0.0192*	0.6775
% remoción de carga Orgánica	0.63	0.0371*	0.0701	0.0239*	0.2208
pH	0.91	0.0001*	<0.001*	0.0017*	0.6402
DQO (mg/L)	0.61	0.0462*	0.2827	0.0107*	0.5805
N-NH3 (mg/L)	0.49	0.1317	0.3985	0.0563	0.2177
SV (g/m2)	0.61	0.0462*	0.4206	0.3069	0.0113*

## 6.2.- Efecto de la relación C/N y los efluentes sobre el perfil metabólico

Las Ecoplate™ de Biolog fueron usadas para medir cualitativa y cuantitativamente, el perfil metabólico de la comunidad del RLM. En la Figura 6.1 se muestran las curvas obtenidas para el AWCD en las placas después de realizar un seguimiento por al menos 120 h.

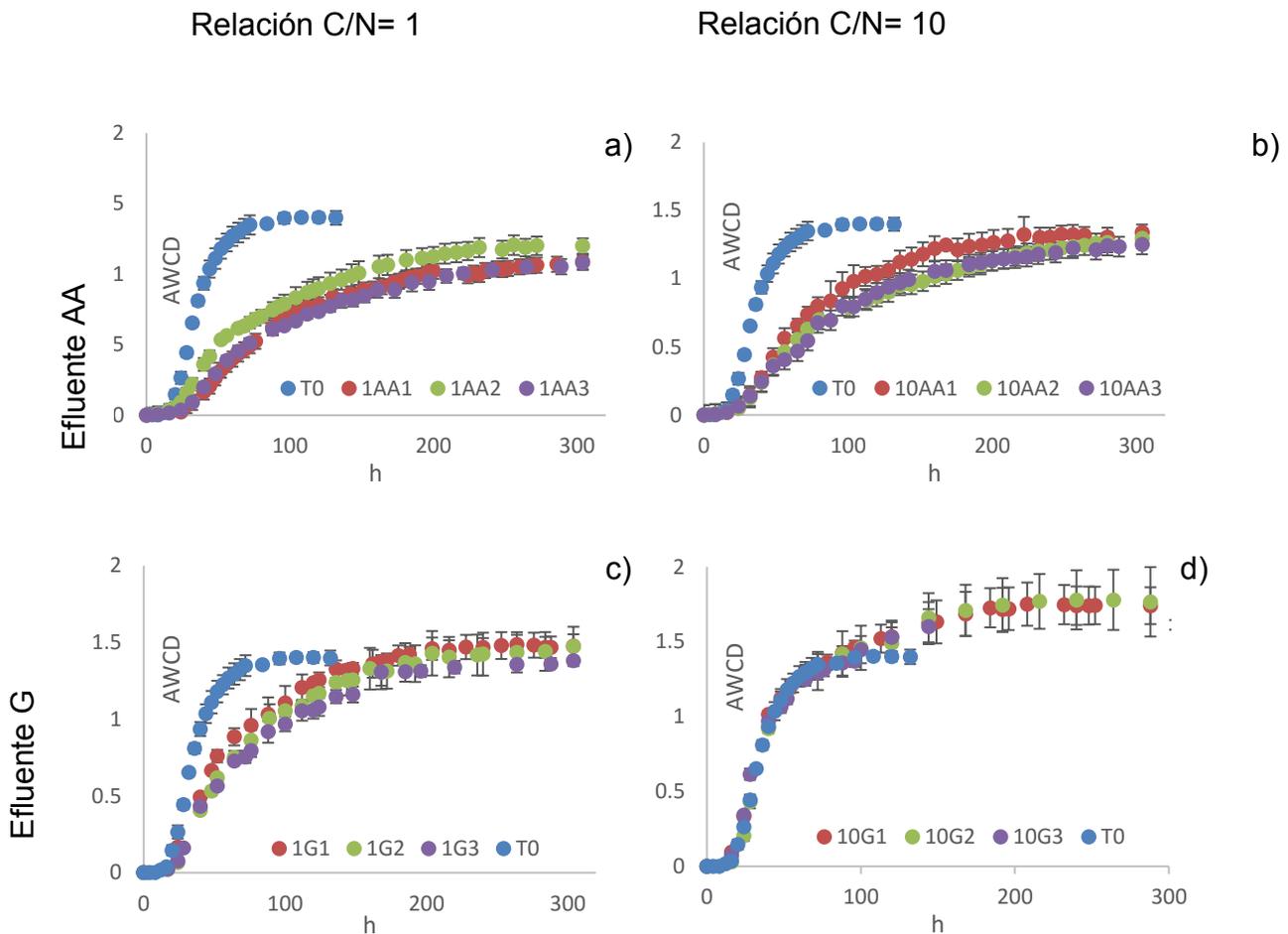


Figura. 6.1 - Desarrollo de color promedio (AWCD) de los sustratos metabolizados por la biopelícula ( $n=3$ ), medido por un tiempo de al menos 120 h, con las diferentes condiciones experimentales a) Efluente AA relación C/N=1, b) Efluente AA relación C/N=10, c) Efluente G, relación C/N=1 d) Efluente G, relación C/N= 10.

En donde se observó que el aprovechamiento promedio de la comunidad fue diferente, cuando se trabajó con las diferentes condiciones experimentales.

En la tabla 6.5, se puede apreciar que conforme incrementó el tiempo, el AWCD también fue incrementando. Éste fue mayor entre la hora 24 y 64, cuando los sustratos contenidos en las placas son provechados por la comunidad bacteriana de la biopelícula. Se encontró que el AWCD para las diferentes condiciones experimentales trabajadas, fue mayor el AWCD cuando se trabajó con la condición 10G.

*Tabla 6.5- Valores del AWCD promedio con su desviación estándar en cada una de las muestras (n=3)*

<b>Muestras</b>	<b>24 h</b>	<b>64 h</b>	<b>120 h</b>
<b>1AA1</b>	0.0527 ± 0.0109	0.4345 ± 0.0210	0.783 ± 0.029
<b>1AA2</b>	0.092 ± 0.0261	0.6165 ± 0.0275	0.898 ± 0.079
<b>1AA3</b>	0.0353 ± 0.0205	0.453 ± 0.0407	0.734 ± 0.025
<b>10AA1</b>	0.0499 ± 0.0088	0.6559 ± 0.04995	1.029 ± 0.063
<b>10AA2</b>	0.0503 ± 0.0190	0.5544 ± 0.1120	0.868 ± 0.099
<b>10AA3</b>	0.0635 ± 0.0202	0.4668 ± 0.0189	0.895 ± 0.023
<b>1G1</b>	0.1673 ± 0.0182	0.8851 ± 0.055	1.237 ± 0.016
<b>1G2</b>	0.0678 ± 0.0144	0.7513 ± 0.0424	1.151 ± 0.068
<b>1G3</b>	0.0761 ± 0.0084	0.7274 ± 0.0074	1.059 ± 0.055
<b>10G1</b>	0.3340 ± 0.0164	1.2946 ± 0.0516	1.534 ± 0.106
<b>10G2</b>	0.2057 ± 0.0352	1.28 ± 0.0551	1.488 ± 0.106
<b>10G3</b>	0.3422 ± 0.0176	1.2494 ± 0.0438	1.529 ± 0.100

En la Tabla 6.6 se muestra que sí existió una diferencia estadísticamente significativa. Con el análisis de ANOVA se pudo comprobar que tanto el efluente como la relación C/N mostraron un efecto significativo en el perfil metabólico de la comunidad.

Tabla 6.6.- Resumen ANOVA de dos vías para el AWCD en los tres puntos para cada condición experimental

	R	p (ANOVA)	p (Efluente)	p (C/N)	Efluente *C/N
AWCD (24 h)	0.83	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
AWCD (64 h)	0.93	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
AWCD (120 h)	0.89	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*

### 6.3.- Análisis de degradación por grupos

Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 6.2) en donde en los primeros dos componentes está representada más del 90 % de la variación explicada, componente 1 (61.278 %) y componente 2 (29.892 %). En el PCA se muestra que la degradación de los sustratos agrupados cuando se trabajó con el efluente a base de glucosa (1G y 10G) no mostró una dinámica de degradación diferente con respecto al tiempo degradándose principalmente carbohidratos con la relación C/N=10, mientras que las comunidades con la relación C/N=1 degradaron carbohidratos y ácidos carboxílicos.

En la Figura 6.2 se aprecia que el grupo 10G a la hora 24 degradaron principalmente sustratos correspondientes al grupo de los polímeros y los carbohidratos, a la hora 64 la degradación fue de aminoácidos y aminos/amidas y a la hora 120, se degradaron polímeros y aminoácidos.

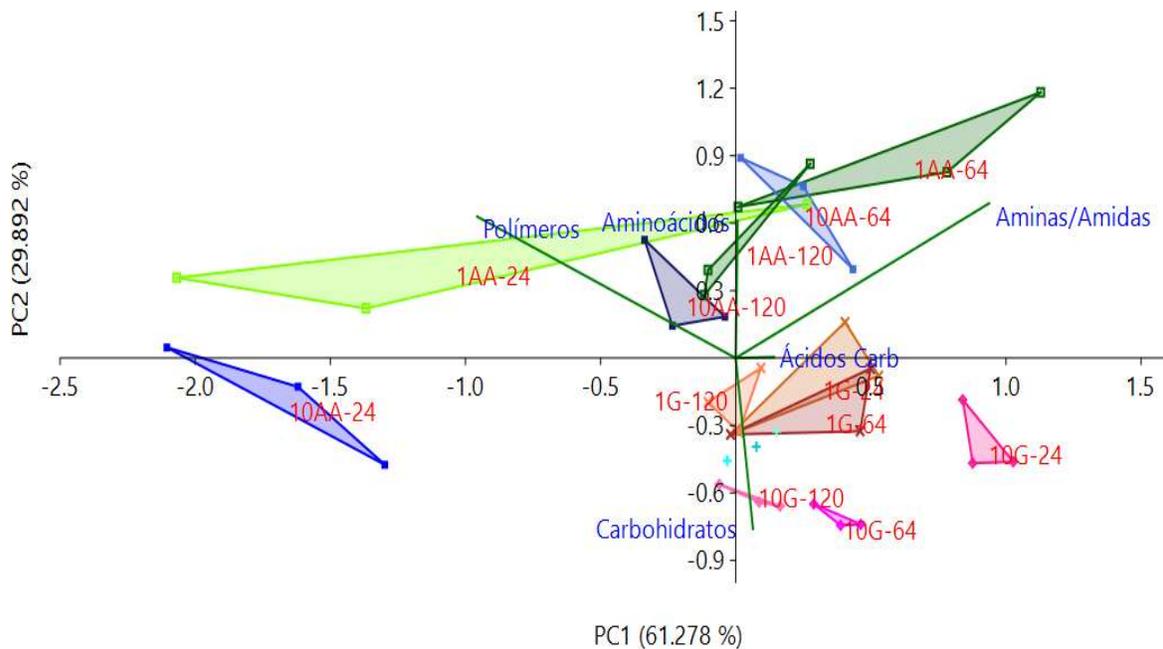


Figura. 6.2.-Análisis de componentes principales de las fuentes de carbono agrupadas aprovechadas por la comunidad de la biopelícula con las diferentes condiciones experimentales a las diferentes horas (24, 64 y 120). Los grupos son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , PERMANOVA).

El grupo de muestras correspondientes 1AA (24, 64 Y 120), degradaron polímeros a la hora 24, aminas y amidas a la hora 64 y a la hora 120 aminoácidos.

#### 6.4.- Análisis de la diversidad metabólica

La evaluación del índice de Shannon en los diferentes tiempos, con las diferentes condiciones experimentales no mostró ser estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) en todos los casos cuando se realizó una evaluación, con la prueba t de Huchenson.

En la figura 6.3, se observa que la variación fue poca, lo cual indica la homogeneidad de la degradación de sustratos de la placa por la comunidad de la biopelícula con las diferentes relaciones C/N y los dos efluentes. El valor del índice de Shannon esta dado entre 0 (cuando únicamente se degrada un sustrato), y el logaritmo de S (sustratos metabolizados) (Magurran, 1988) . Si la comunidad es capaz de degradar los 31 sustratos contenidos en la placa Ecoplate, este valor va a llegar a ser de 3.4333.

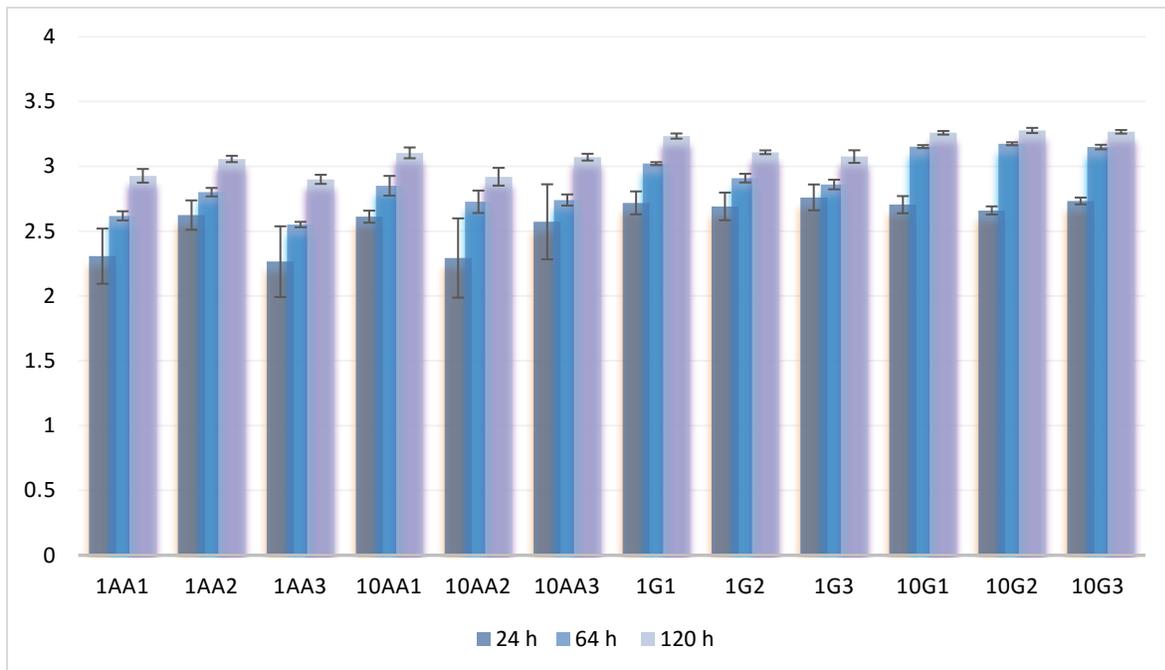


Figura. 6.3.-Índices de Shannon en cada de las condiciones experimentales en los diferentes tiempos, 24, 64 y 120 (n=3).

En la figura 6.3 se observa que cuando se evaluó el índice de Shannon a las diferentes horas, éste fue aumentando, lo cual demuestra un incremento gradual en la degradación de sustratos.

La evaluación del índice de Shannon a la hora 64 mediante la prueba t de Huchenson no mostró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las semanas evaluadas entre las diferentes relaciones C/N para el efluente a base de ácido acético, a base de glucosa y tampoco para la diferencia entre las relaciones C/N=1 de ambos sustratos (AA y G), ni relación C/N=10 (c.f. Anexo A).

Aunque no se mostró diferencia estadísticamente significativa. El mayor índice de diversidad de Shannon medido en las placas se obtuvo cuando se trabajó con 10G y el menor se obtuvo cuando se trabajó con las condiciones experimentales de 1AA.

En la hora 24 la equitatividad de Shannon estuvo arriba del 0.5 (Tabla 6.7), a la hora 120 se aprecia que todos los valores fueron superiores al 0.66 y alcanzaron valores de 0.88.

*Tabla. 6.7.- Equitatividad y sustratos degradados de cada una de las muestras con las diferentes condiciones experimentales (n=3).*

Muestras	Equitatividad			Sustratos degradados		
	24 h	64 h	120 h	24 h	64 h	120 h
<b>1AA1</b>	0.424 ± 0.027	0.515±0.015	0.7132±0.034	26.6 0± 0.6	26.67 ± 1.5	26.33 ± 3.1
<b>1AA2</b>	0.548 ± 0.022	0.561±0.010	0.708±0.017	25.30± 3.2	29.33 ± 0.6	30.00 ± 0.0
<b>1AA3</b>	0.6288 ± 0.011	0.548±0.062	0.634±0.008	16.00 ± 6.1	23.67 ± 3.2	28.67 ± 1.5
<b>10AA1</b>	0.587 ± 0.039	0.662±0.035	0.752±0.018	22.33 ± 2.3	26.33 ± 3.7	29.67 ± 0.6
<b>10AA2</b>	0.513 ± 0.089	0.618±0.099	0.666±0.029	20.00 ± 9.5	25.67 ± 6.6	28.00 ± 3.4
<b>10AA3</b>	0.615 ± 0.091	0.669±0.043	0.752±0.008	22.33 ± 7.0	23.33 ± 3.2	28.67 ± 0.6
<b>1G1</b>	0.618 ± 0.017	0.691±0.006	0.855±0.008	24.6 0± 3.2	29.67 ± 0.5	29.67 ± 0.6
<b>1G2</b>	0.627 ± 0.180	0.649±0.027	0.772±0.024	23.67 ± 3.2	28.33 ± 2.1	29.00 ± 1.0
<b>1G3</b>	0.690 ± 0.019	0.716±0.067	0.785±0.032	23.00 ± 2.6	24.67 ± 3.5	27.67 ± 2.4
<b>10G1</b>	0.586 ± 0.038	0.789±0.015	0.867±0.012	25.67 ± 3.2	29.67 ± 0.5	30.00 ± 0.0
<b>10G2</b>	0.588 ± 0.020	0.797±0.009	0.883±0.017	24.33 ± 1.1	30.00 ± 0.0	30.00 ± 0.0
<b>10G3</b>	0.569 ± 0.014	0.777±0.013	0.884±0.021	27.00 ± 0.0	30.00 ± 0.0	29.67 ± 0.6

En cuanto a la cantidad de sustratos degradados a partir de la hora 64 existe una degradación de más del 90 % de los que se degradarían hasta la hora 120. La tendencia de la degradación, al igual que en el índice de Shannon y Equitatividad, fue mayor cuando se trabajó con el sustrato más complejo y a una mayor relación C/N.

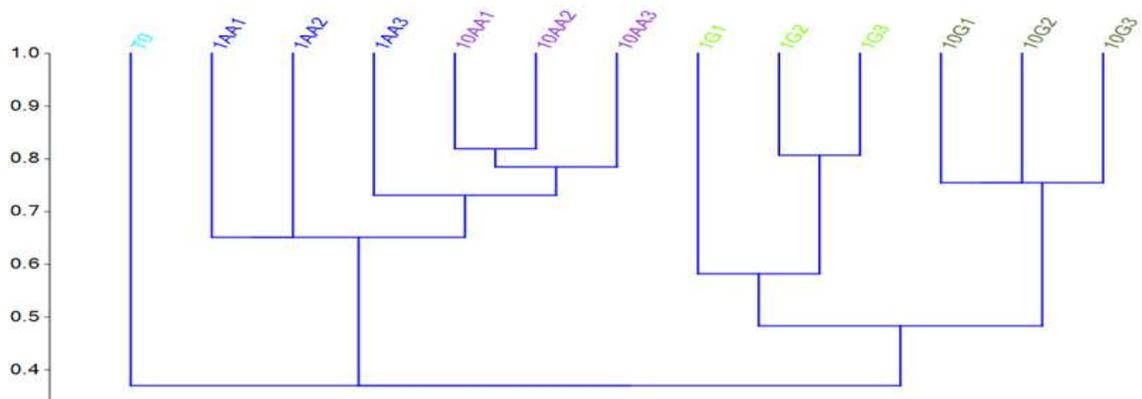


Figura 6.4.- Diversidad Beta, formación de grupos, por efluentes mediante el índice de Bray-Curtis (0.723) a las 24 h

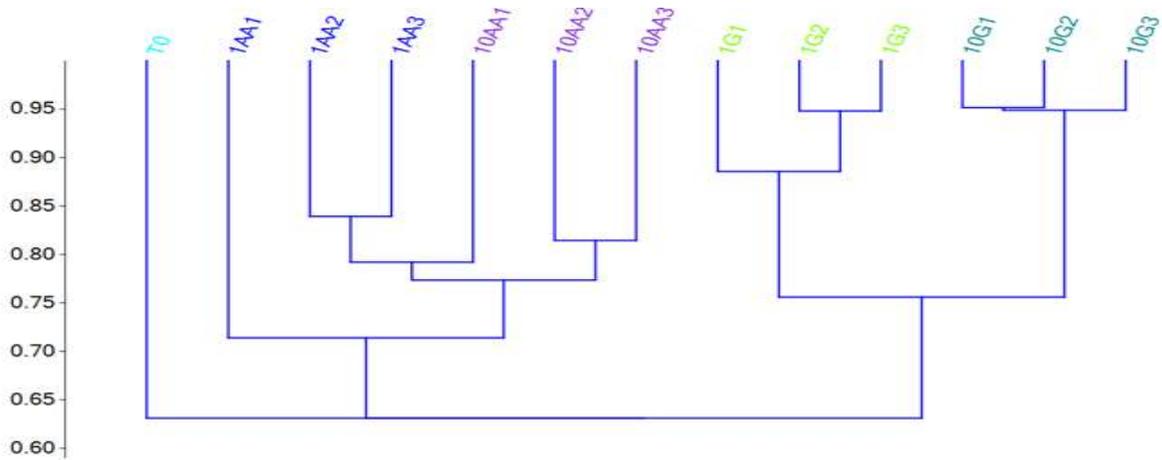


Figura 6.5. - Diversidad Beta, formación de grupos, por efluentes, Bray-Curtis (0.7034) a la hora 64.

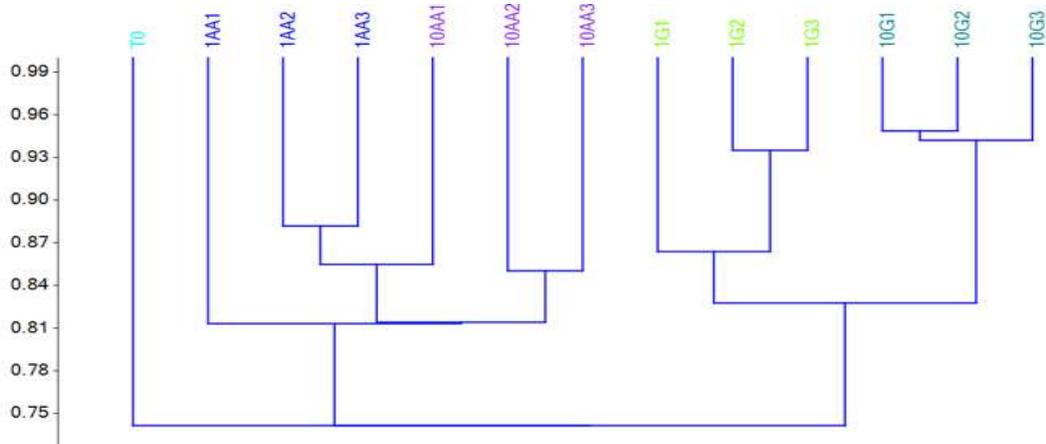


Figura 6.6.- Diversidad Beta, formación de grupos, por efluentes, Bray-Curtis (0.7045) a las 120 h

El dendrograma elaborado con base en el coeficiente de similitud de Bray-Curtis mediante un análisis jerárquico mostró una separación marcada entre los efluentes trabajados. En el dendrograma se observan dos agrupaciones consistentes similares en las tres horas evaluadas. Esta agrupación se dio con base en el sustrato del efluente sintético (AA Y G) y de manera menos marcada se presentó un agrupamiento por relación C/N trabajada (Figuras 6.4, 6.5 y 6.6).

La similitud incrementó con el tiempo. A la hora 24 se obtuvo una similitud mayor al 50 % mientras que a la hora 120, todas las muestras presentaron un porcentaje de similitud mayor al 80 %. Cuando se trabajó con el efluente a base de glucosa, se obtuvo un mayor porcentaje de similitud entre las muestras trabajadas con las diferentes relaciones C/N en comparación al efluente a base de ácido acético.

Dado que no se observó diferencia entre las horas evaluadas, únicamente se correlaciona las variables de respuesta del reactor con las variables metabólicas a la hora 64 que es cuando se encontraban en fase exponencial las cinéticas. El análisis de correspondencia canónica entre el perfil metabólico de la comunidad y los factores de operación del reactor medidos con las diferentes condiciones experimentales reveló que las muestras trabajadas con las mismas condiciones experimentales se comportaron de manera muy similar (Figura 6.7). Los agrupamientos obtenidos mostraron que los parámetros de operación del reactor, que determinaron la separación de las muestras de cada uno de los tratamientos fueron temperatura y pH, así como la DQO.

Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 90.21 % de la varianza total. Se observó una clara diferencia en la actividad metabólica de ambos efluentes trabajados a lo largo del primer eje canónico 1. A su vez se confirmó mediante este ordenamiento la separación de las muestras de acuerdo con las semanas trabajadas a lo largo del eje canónico 2.

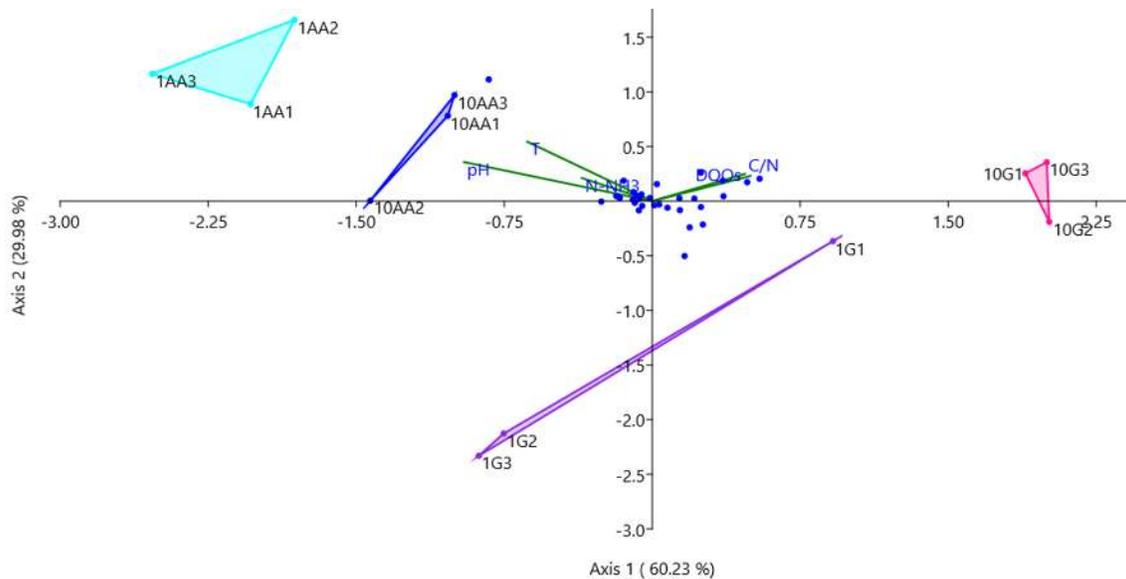


Figura 6.7.- Análisis de correspondencia canónica entre el perfil metabólico de la comunidad y los parámetros de operación del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas trabajadas.

Para relacionar la diversidad metabólica de la comunidad obtenida en las diferentes condiciones experimentales trabajadas y la degradación de los contaminantes en el reactor de lecho móvil se realizó un análisis de correspondencia canónica donde se observó que las muestras se separan a lo largo de los diferentes ejes (Figura 6.8). El primer eje canónico, estuvo influenciado directamente por los SVb (Sólidos volátiles en la biopelícula) (0.063) y % de remoción de CO (-0.296) mientras que el eje canónico 2 estuvo influenciado por la relación C/N (0.413) y por el % de remoción de CA (-0.499). También se puede apreciar que el % de remoción de CA, estuvo relacionado con una mayor degradación de aminos-amidas, mientras que el % de remoción de CO, mostró una fuerte correlación con la degradación de carbohidratos.

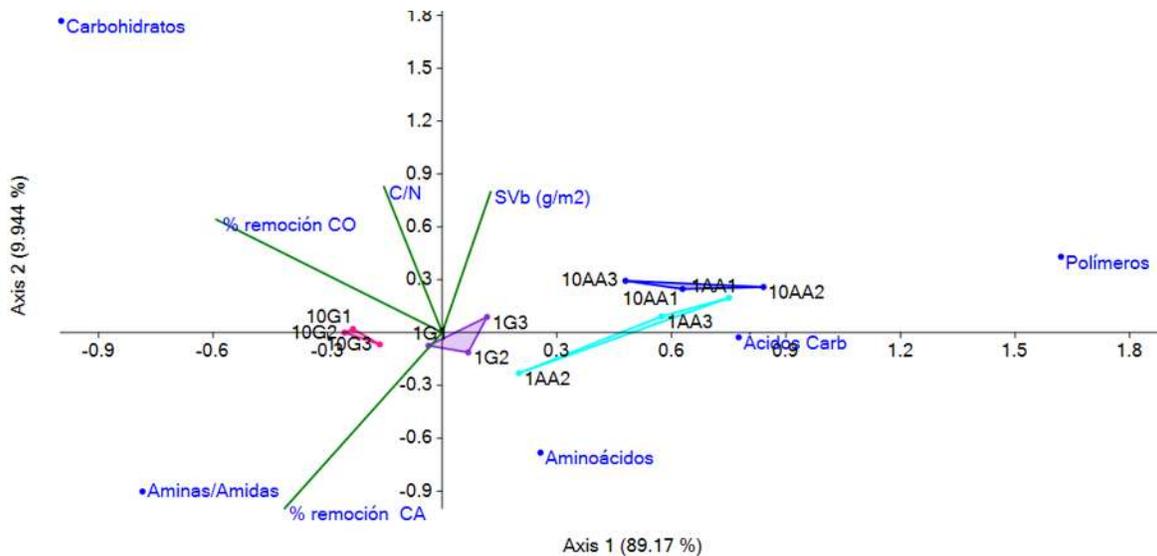


Figura 6.8.- Análisis de correspondencia canónica entre el perfil metabólico de la comunidad por grupos y la respuesta del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas trabajadas.

### 6.5.- Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen 16S

En el análisis del perfil de restricción del marcador rRNA 16S (Figura 6.9) se obtuvo un total de 15 TRFs de éstos, 7 fueron generados con la enzima *HaeIII* (Ha) y 8 con la enzima *HhaI* (Hh). Las condiciones experimentales en la biopelícula del RLM fueron determinantes para la presencia de ciertos TRF ya que existe una mayor similitud cuando se trabajó con el mismo efluente. En el caso del TRF 307-Ha únicamente estuvo presente cuando se trabajó con la condición experimental 10AA, mientras que el 70-Ha cuando se trabajó con 1G. Para la enzima *HhaI* únicamente se encontró diferencia entre las condiciones 1AA y 10AA. Por tanto, los TRFs encontrados en las diferentes condiciones experimentales variaron con respecto a la relación C/N con el efluente a base de ácido acético, pero no es así con el efluente a base de glucosa.

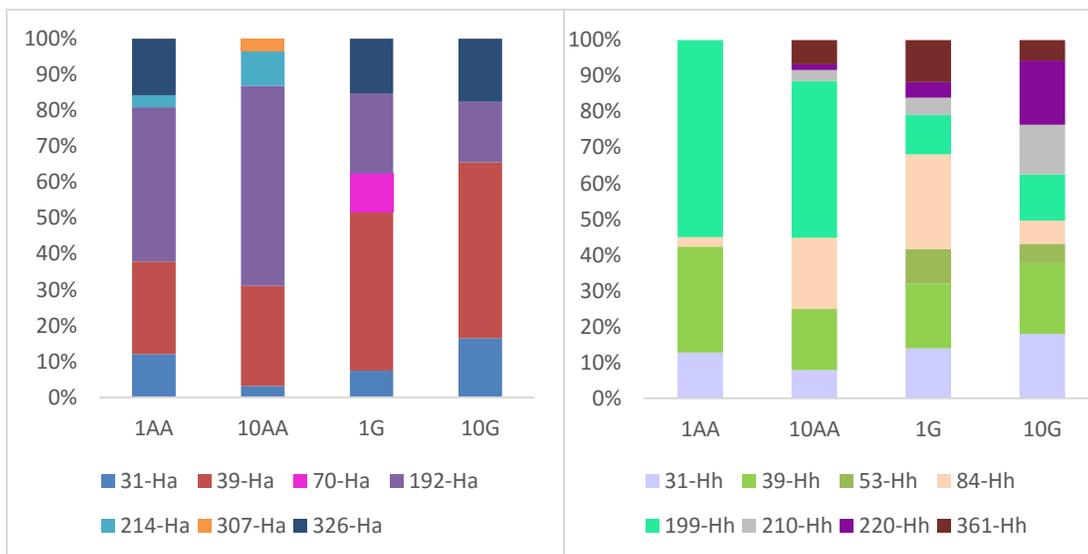


Figura 6.9.- Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido de cada condición experimental ( $n=3$ ). Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, *HaeIII*; Hh: *HhaI*). Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10 (C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).

Al estimar la riqueza, diversidad y equitatividad de las comunidades bacterianas (Tabla 6.8), se observa que la riqueza de TRFs fue significativamente diferente en cada una de las condiciones trabajadas ( $p=0.001$ ). Sin embargo, al evaluar el índice de Shannon mediante la prueba t de Hutchenson se observa que no existió una diferencia estadísticamente significativa (*c.f.* Anexo B) cuando se evaluó con las dos relaciones C/N trabajadas con cada uno de los efluentes, ni tampoco cuando se evaluó con la misma relación C/N trabajada con los diferentes efluentes. No hay que perder de vista que este índice se ve influenciado tanto por el número de TRFs presentes como la abundancia (tamaño del pico) de estos.

Tabla. 6.8.- Índice de Shannon, equitatividad y TRFs para el gen 16S de cada una de las condiciones experimentales trabajadas (n=3). Donde Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).

	1AA	10AA	1G	10G
Diversidad de la comunidad				
<b>Shannon</b>	1.86 ± 0.11	1.97 ± 0.08	2.32 ± 0.07	2.17 ± 0.04
<b>Equitatividad</b>	0.74 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.79 ± 0.06	0.8 ± 0.04
<b>TRFs</b>	8.67 ± 0.58 <sup>d</sup>	11 ± 0.00 <sup>c</sup>	13 ± 0.00 <sup>a</sup>	12 ± 0.00 <sup>b</sup>

El análisis de agrupamiento de los perfiles de TRFLP mediante el índice de Bray-Curtis y usando un método jerárquico mostró de manera clara que para el gen 16S, las comunidades bacterianas se separaron primero por el efluente trabajado y posteriormente por la relación C/N trabajada (Figura 6.10). Todas las muestras de cada una de las condiciones mostraron un porcentaje de agrupamiento mayor al 80 % con excepción de 1G, que presento menos porcentaje de similitud.

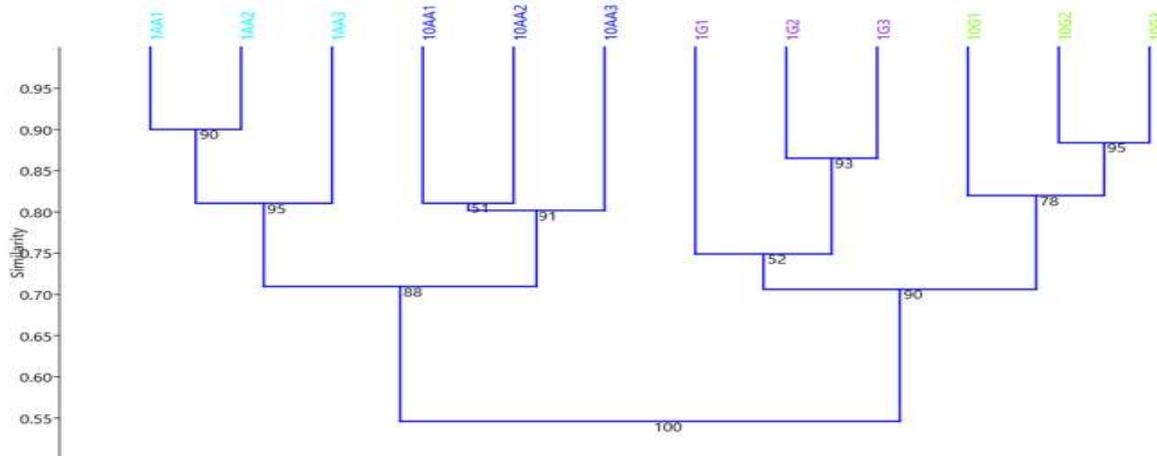


Figura 6.10.- Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen 16S obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA, usando un método jerárquico.

El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP correspondientes al gen 16S y los factores de operación del reactor medidos en cada una de las condiciones experimentales trabajadas se muestran en la figura 6.11. Este análisis permitió corroborar el agrupamiento obtenido en el dendrograma pero a su vez determinar qué factores de operación se relacionaron con el ordenamiento observado. Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 91.51 % de la varianza total. Se puede observar una clara separación con las diferentes condiciones trabajadas, donde en el eje 1 negativo se agruparon las muestras correspondientes al efluente a base de ácido acético y en el eje 1 positivo se agruparon las muestras trabajadas con el efluente a base de glucosa. El ordenamiento de la comunidad bacteriana en la biopelícula del reactor estuvo determinado por el pH (-0.719394) y la temperatura (-0.666115). Estos factores influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1. Siendo los responsables de la separación observada entre las comunidades de ambos efluentes trabajados a lo largo del eje canónico 1. En cuanto al eje canónico 2, estuvo determinado tanto por la DQOs (0.897471) y la temperatura (-0.619172).

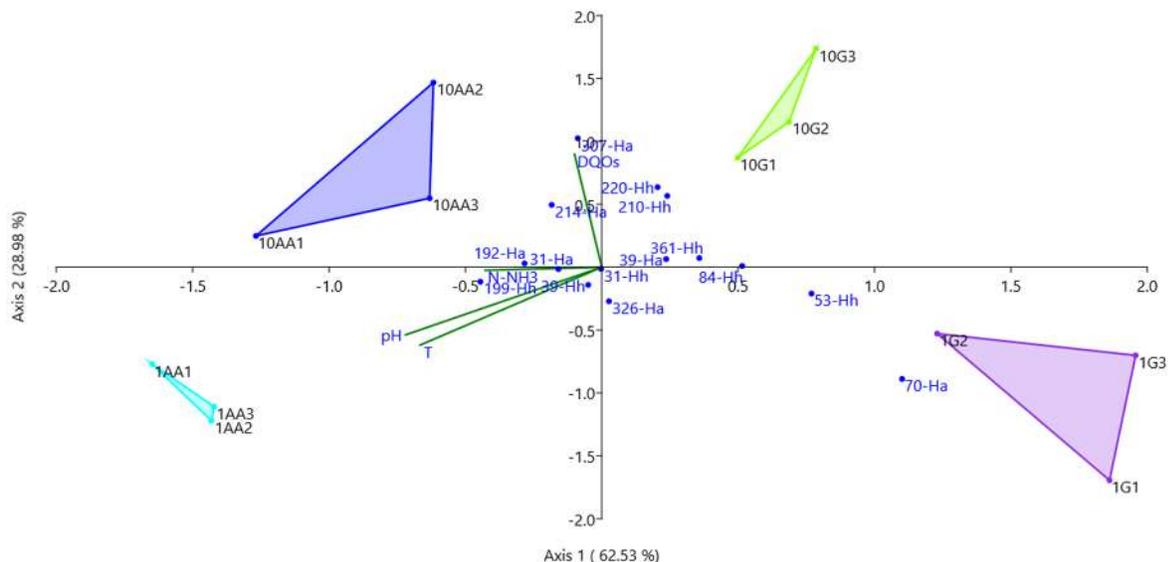


Figura 6.11.- Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen 16S y los parámetros medidos de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen 16S obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI).

## 6.6.- Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen *beta-amo*

En el análisis del perfil de restricción para el gen *beta-amo* (Figura 6.12) se obtuvo un total de 9 TRFs. De éstos, 2 fueron generados con la enzima *HaeIII* (Ha) y 7 con la enzima *HhaI* (Hh). Las condiciones experimentales en la biopelícula del RLM fueron determinantes para la presencia de ciertos TRFs a diferencia del gen 16S se tiene que los TRFs determinados para el gen *beta-amo*, existe una mayor similitud cuando se trabajó con la misma relación C/N, que cuando se trabajó con el mismo efluente. En el caso de los 2 TRFs obtenidos con la enzima *HaeIII*, están presentes en las 4 condiciones experimentales trabajadas, solo que, en diferentes porcentajes. Con la relación C/N= 10 se obtuvo un mayor porcentaje de el TRF 62-Ha tanto para el efluente a base de glucosa (G) como para el efluente a base de ácido acético (AA). El TRF 86-Ha se obtuvo un porcentaje mayor al 80 % cuando se trabajó con la relación C/N=1 en ambos efluentes.

Para los TRFs obtenidos con la enzima *HhaI*, se encontró que para la relación C/N=1, en ambos efluentes, se obtuvo un porcentaje mayor al 70 %, para el TRF 434-Hh. Sin embargo, cuando se trabajó con la relación C/N= 10, el TRF encontrado en mayor porcentaje fue el 71-Hh.

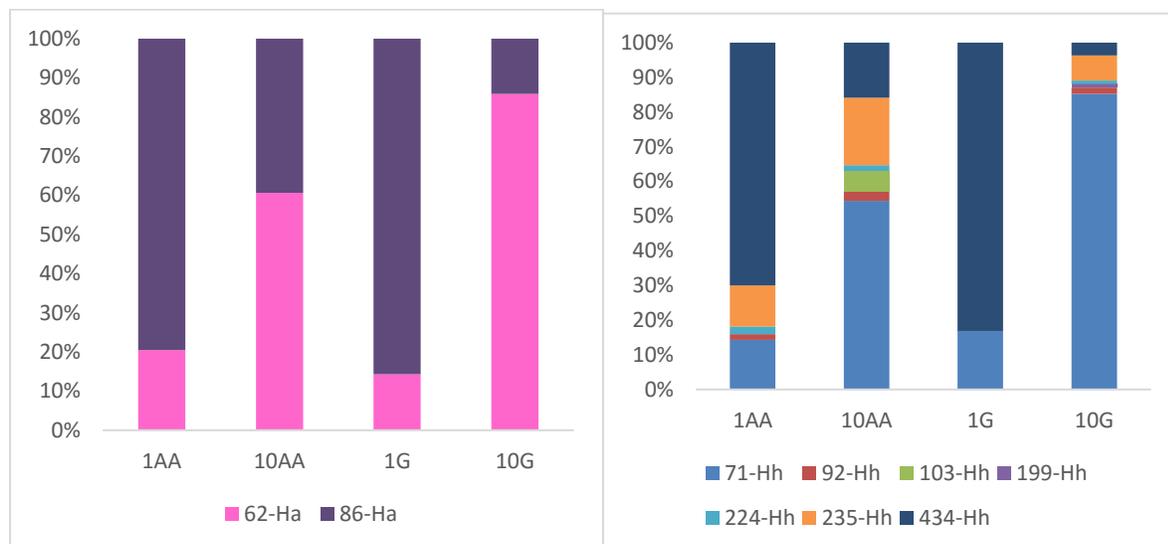


Figura 6.12.- Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido para el gen *beta-amo* (n=3). Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, *HaeIII*; Hh: *HhaI*). Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa). 51

Tabla. 6.9.- Índice de Shannon, equitatividad y TRFs para el gen *beta-amo* de cada una de las condiciones experimentales trabajadas ( $n=3$ ). Donde Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10(C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).

	1AA	10AA	1G	10G
<b>Diversidad de la comunidad</b>				
<b>Shannon</b>	1.26 ± 0.515	1.54 ± 0.07	1.02 ± 0.32	1.11 ± 0.406
<b>Equitatividad</b>	0.86 ± 0.12	0.79 ± 0.10	0.88 ± 0.17	0.61 ± 0.04
<b>TRFs</b>	4.66 ± 2.51	6 ± 1.00	3.33 ± 1.15	5.33 ± 2.30

Al estimar la riqueza, diversidad y equitatividad de las comunidades bacterianas (Tabla 6.9), se encontró que existe poca diferencia entre estos tres parámetros de diversidad evaluados. El mayor número de TRFs fue cuando se trabajó con la relación C/N=10, pero esta diferencia, no fue estadísticamente significativa ( $p= 0.399$ ).

Al evaluar el índice de Shannon mediante la prueba t de Hutchenson se observa que no existió una diferencia estadísticamente significativa (*c.f.* Anexo C) cuando se evaluó con las dos relaciones C/N trabajadas con cada uno de los efluentes. Ni tampoco cuando se evaluó con la misma relación C/N trabajada con los diferentes efluentes.

El análisis de agrupamiento de los perfiles de TRFLP mediante el índice de Bray-Curtis mostró de manera clara que para el gen *beta-amo*, las comunidades bacterianas se separaron por la relación C/N trabajada y no por el efluente como fue el caso del gen 16S (Figura 6.13).

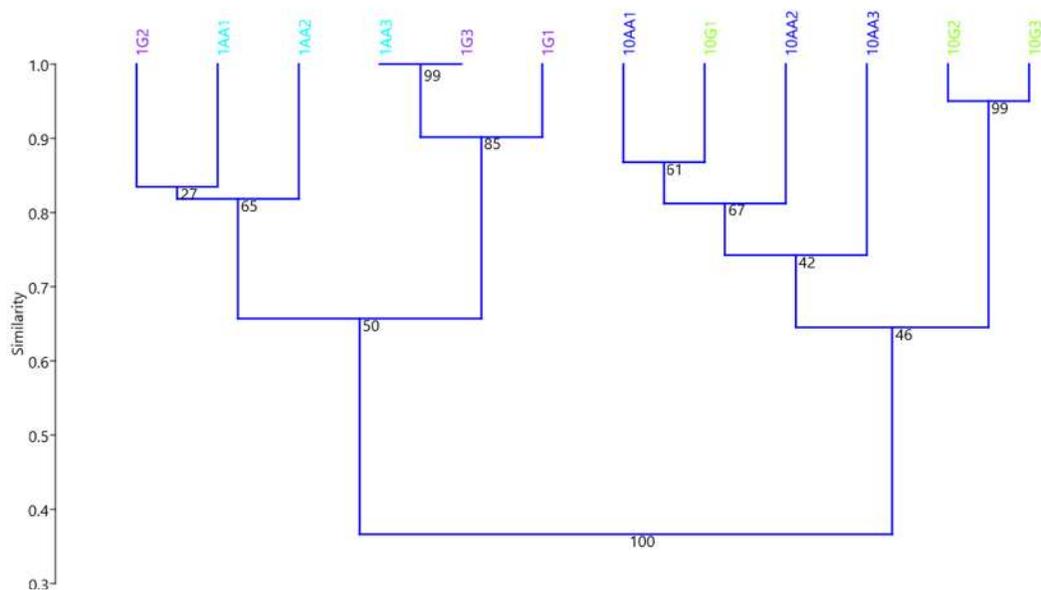


Figura 6.13.- Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *beta-amo* obtenidos con las dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *HhaI*). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA, usando un método jerárquico.

El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP correspondientes al gen *beta-amo* y los factores de operación del reactor medidos en cada una de las condiciones experimentales trabajadas se muestran en la figura 6.14. El análisis de correspondencia canónica permitió corroborar el agrupamiento obtenido en el dendrograma pero a su vez determinar qué factores de operación se relacionaron con el ordenamiento observado. Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 98.232 % de la varianza total. Se puede observar una clara separación con las diferentes condiciones trabajadas, donde en la Axis 1 negativa se agruparon las muestras correspondientes a la relación C/N=1 tanto del efluente a base de ácido acético (AA), así como para el efluente a base de glucosa (G) y en la Axis 1 positiva se agruparon las muestras trabajadas con la relación C/N=10. El ordenamiento de la comunidad bacteriana en la biopelícula del reactor estuvo determinado por la DQOs (0.8858) y el pH (-0.5254).

Estos factores influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1. En cuanto al eje canónico 2, estuvo determinado únicamente por el nitrógeno amoniacal (0.6258).

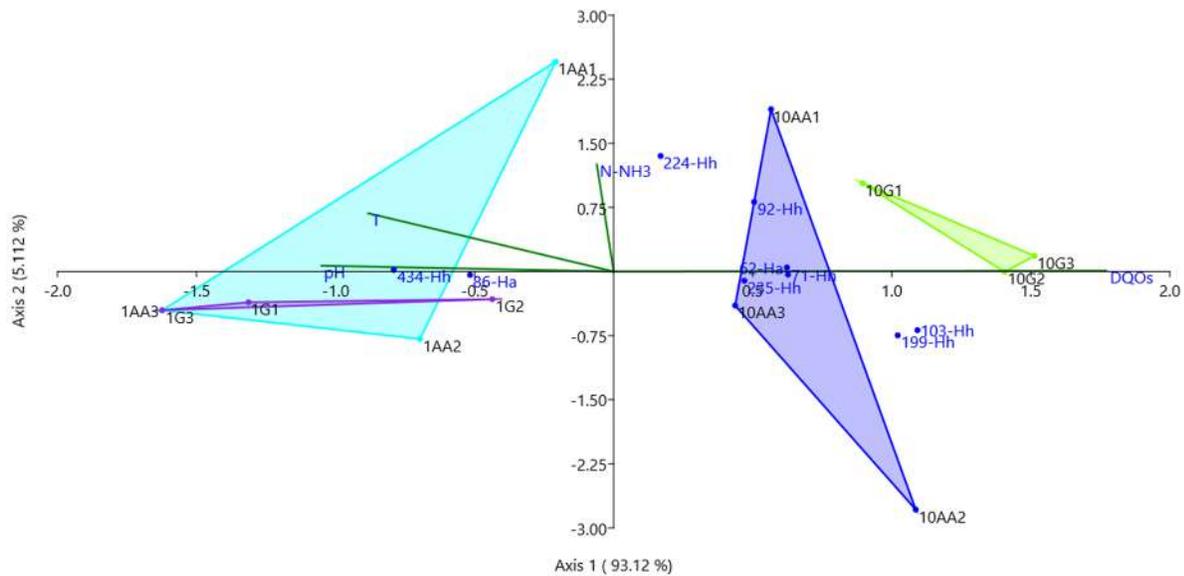


Figura 6.14.- Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen beta-amo y los parámetros medidos de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen beta-amo obtenidos con las dos enzimas de restricción (HaeIII y HhaI).

## 6.7 - Efecto de la relación C/N sobre la estructura de la comunidad a través de TRFLP con el gen *nirS*

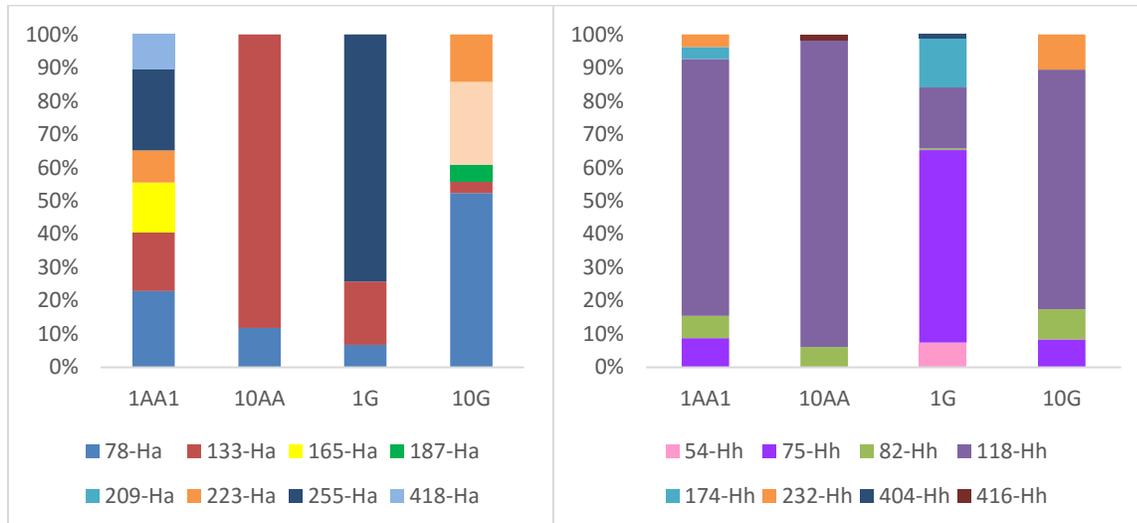


Figura 6.15.- Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido para el gen *nirS*. Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (Ha, *HaellI*; Hh: *HhaI*). Cada condición experimental corresponde a 1 (relación C/N=1), 10 (C/N=10), AA (efluente a base de ácido acético) y G (efluente a base de glucosa).

En el análisis del perfil de restricción para el gen *nirS* (Figura 6.15) se obtuvo un total de 16 TRFs. De éstos, 8 fueron generados con la enzima *HaellI* (Ha) y 8 con la enzima *HhaI* (Hh). Los perfiles de TRFLP de las diferentes condiciones experimentales mostraron diferencias en la diversidad de los filotipos de nitrificantes, aun cuando hubo TRFs comunes en los dos efluentes, con las dos relaciones tales como 78-Ha, 133-Ha y 118-Hh que presentaron diferentes abundancias relativas.

A diferencia de los otros dos genes analizados, aquí se encontró una mayor variabilidad de los TRFs, únicamente compartiendo 3 en todas las condiciones trabajadas.

El mayor número de TRF encontrados fue con las dos relaciones C/N=1 (Tabla 6.22), sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.1019$ ).

En el análisis de la diversidad de la comunidad (Tabla 6.10) para el gen *nirs* se observa que la menor diversidad para este gen fue cuando se trabajó con el efluente a base de ácido acético y la relación C/N=10 (10AA).

Cuando se compara de manera estadística el índice de Shannon no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (c.f. Anexo D).

*Tabla. 6.10.- Equitatividad y sustratos degradados de cada una de las muestras con las diferentes condiciones experimentales (n=3).*

	<b>1AA</b>	<b>10AA</b>	<b>1G</b>	<b>10G</b>
	Diversidad de la comunidad			
<b>Shannon</b>	1.45 ± 0.19	0.95 ± 0.18	1.51 ± 0.26	1.36 ± 0.26
<b>Equitatividad</b>	0.76 ± 0.05	0.71 ± 0.07	0.72 ± 0.05	0.75 ± 0.05
<b>TRFs</b>	5.67± 1.15	3.67± 0.58	6.33 ± 1.15	5.33 ± 1.5330

El análisis de agrupamiento de los perfiles de TRFLP mediante el índice de Bray-Curtis mostró de manera clara que para el gen *nirS*, las comunidades bacterianas se separaron de manera muy general por la relación C/N trabajada (Figura 6.16). Se observa que la diversidad para el gen *nirS*, trabajada con las diferentes condiciones experimentales, es mayormente afectada por la relación C/N.

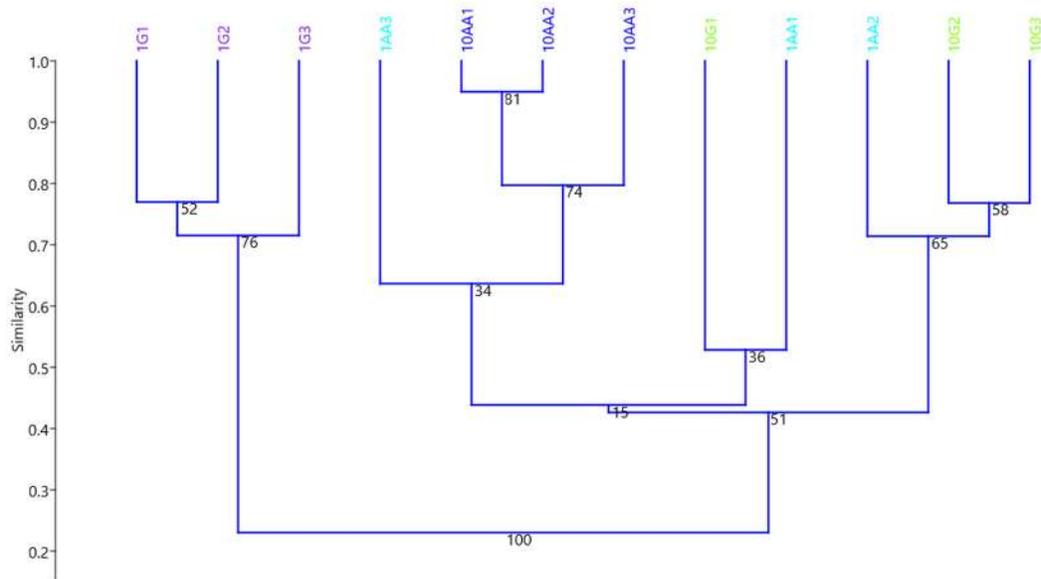


Figura 6.16.- Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreado. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *nirS* obtenidos con las dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *HhaI*). El dendrograma fue construido usando el índice de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA, usando un método jerárquico.

El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP correspondientes al gen *nirS* y los factores de operación del reactor medidos en cada una de las condiciones experimentales trabajadas se muestran en la figura 6.17. Este análisis permitió corroborar el agrupamiento obtenido en el dendrograma pero a su vez determinar qué factores de operación se relacionaron con el ordenamiento observado. Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 86.41 % de la varianza total. Se puede observar una clara separación con las diferentes condiciones trabajadas, donde en el eje 1 negativa se agruparon las muestras correspondientes a la relación C/N=1 del efluente a base de glucosa (G) y en el eje 1 positiva se agruparon las muestras trabajadas con la relación C/N=1 y 10 del efluente a base de ácido acético y de la relación C/N=10 del efluente a base de glucosa. El ordenamiento de la comunidad bacteriana en la biopelícula del reactor estuvo determinado por la DQOs (0.729) y el pH (-0.1016). Estos factores influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1, generando dos comunidades separadas

con ambas relaciones C/N trabajadas. En cuanto al eje canónico 2, estuvo determinado tanto por la temperatura (0.7248) así como por la DQOs (-0.395).

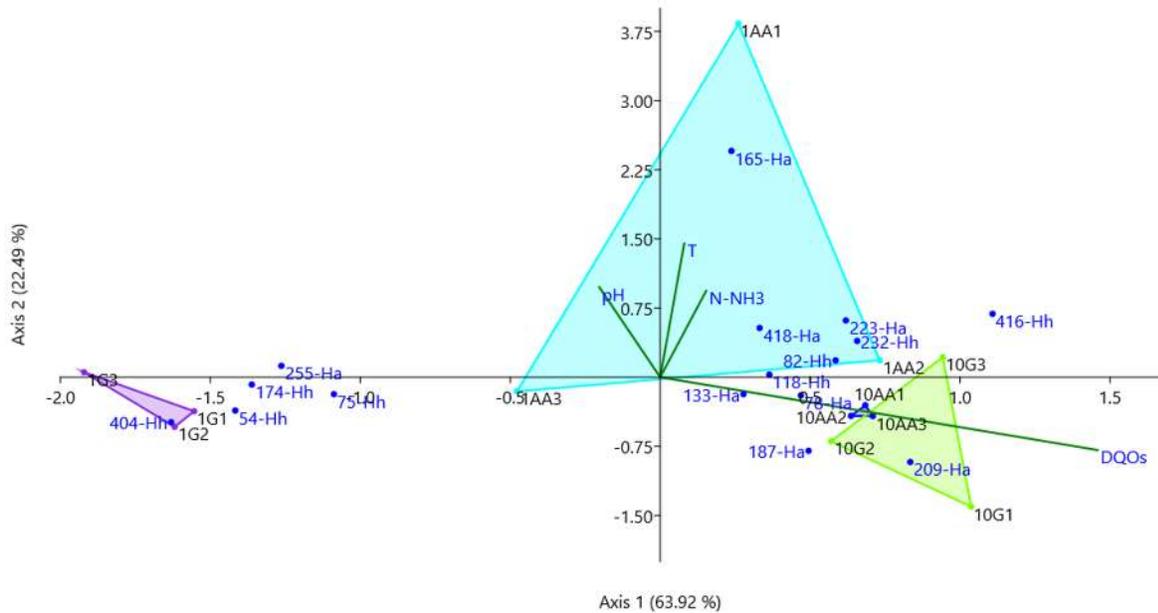


Figura 6.17.- Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen *nirS* y los parámetros medidos de las comunidades bacterianas de la biopelícula del reactor de lecho móvil, con los dos sustratos, ácido acético (AA), glucosa (G) con las dos relaciones C/N, 1 y 10 durante las diferentes semanas monitoreadas. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *nirS* obtenidos con las dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *HhaI*).

## **VII. – Discusión de resultados**

En general, hay escasa información sobre la estructura y la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas en la biopelícula de los reactores de lecho móvil en el tratamiento de efluentes acuícolas, ya que la mayoría de los estudios se han enfocado en estudiar únicamente que tan eficientes son en la remoción de los contaminantes. Sin embargo, es de suma importancia, conocer la diversidad metabólica y estructura genética de la comunidad para con ello poder relacionar qué microorganismos y qué mecanismos se llevan a cabo durante la remoción de los contaminantes, así como también conocer qué factores ambientales o de operación influyen en la conformación de las comunidades bacterianas.

### **7.1.- Remoción de contaminantes en el reactor de lecho móvil**

La remoción de contaminantes (*i.e.* materia orgánica y el nitrógeno amoniacal) depende de varios factores, entre ellos los abióticos, como la temperatura y el pH.

#### **7.1.1. Nitrificación**

El rango de temperatura reportado como adecuado para que se lleve a cabo el proceso de nitrificación va de 14 a 17 °C (Zhu y Chen, 2002) cuando no se tiene limitación de oxígeno (Ebeling *et al.*, 2006). En el presente estudio, la temperatura se mantuvo dentro de ese rango adecuado para que se pudiera llevar a cabo la remoción de contaminantes (Tabla 6.1). Sin embargo, la velocidad de nitrificación sí está delimitada por la temperatura (Zhu y Chen, 2002). El proceso de nitrificación también depende del pH, y la relación C/N del sustrato de alimentación.

El proceso de nitrificación se lleva a cabo en un rango de pH de entre 7.0 y 9.0 (Ebeling *et al.*, 2006). Cuando hay cambios bruscos de 0.5 o más unidades de pH, los microorganismos se deben adaptar a las nuevas condiciones ambientales (Ebeling *et al.*, 2006). Este proceso de adaptación afecta la actividad metabólica y la velocidad de los procesos bacterianos, sin que se altere la estructura genética de la comunidad bacteriana, ni la diversidad a corto plazo en el reactor (Zamora, 2012). En este estudio no se presentaron variaciones mayores a 0.07 unidades de pH entre cada una de las condiciones trabajadas (Tabla 6.1), por lo tanto, se considera que la diversidad metabólica y estructura de la comunidad no fue afectada por este factor. Sin embargo, se puede observar que entre cada una de las condiciones experimentales sí existió una variación mayor a 0.5 unidades, lo cual se ve reflejado en el cambio en la capacidad metabólica y estructura de la comunidad, entre las diferentes condiciones experimentales trabajadas.

### **7.1.2. Desnitrificación**

El proceso de desnitrificación se puede llevar a cabo con un rango más amplio de temperatura, que va desde los 5 °C hasta los 50 °C (Reboleido-Rivas *et al.*, 2012). Sin embargo, en aplicaciones prácticas de acuicultura, la temperatura con la que opera el reactor es normalmente determinada por el requerimiento de la especie de cultivo y no necesariamente por las necesidades de las bacterias en el reactor (Ebeling y Timmons, 2012). Estas temperaturas afectan directamente tanto la remoción de los contaminantes, como a la tasa de nitrificación. En caso de que la temperatura permita que se lleven a cabo los procesos de remoción de contaminantes, la estructura genética de la comunidad sí puede ser afectada. También hay que tener presente que los cambios de temperatura pueden reducir las tasas de remoción de contaminantes y consecuentemente la capacidad de degradación de los contaminantes en el reactor.

### **7.1.3. Remoción biológica de nitrógeno en el RLM del RAS**

La remoción biológica de nitrógeno se da de manera completa cuando se presentan los dos procesos (*i.e.* nitrificación y desnitrificación) de manera simultánea al interior de la biopelícula o bien de manera secuencial en dos etapas de un reactor biológico. En esta experimentación únicamente se llevó a cabo el proceso de nitrificación (Tabla 6.2), como se puede constatar con el incremento de la concentración de nitratos a la salida del reactor. La desnitrificación en contraparte no se llevó a cabo debido a la baja densidad de bacterias heterótrofas, que se encargan de llevar a cabo el proceso de desnitrificación cuando el reactor se encuentra en condiciones anóxicas (Ebeling *et al.*, 2006) y consecuentemente se tengan bajas concentraciones de oxígeno disuelto al interior de la biopelícula.

La presencia de los nitratos es menos tóxica para los peces que la del nitrógeno amoniacal, ya que algunas especies son capaces de soportar hasta 200 mg/L de N-NO<sub>3</sub>, mientras que concentraciones de dos órdenes de magnitud menores de NAT ya se reportan tóxicas para algunas especies (Ebeling y Timmons, 2012). En este sentido resulta más conveniente y seguro para el cultivo acuícola garantizar al menos la oxidación del NAT a nitratos. Aun así, se sugiere que después de la fase aerobia de tratamiento en el RLM se acople otra etapa anóxica para completar el proceso de remoción biológica de nitrógeno, por medio de la desnitrificación.

El agua obtenida en el efluente tiene una calidad tal (Tabla 6.2) que puede ser reusada en un sistema RAS. Las concentraciones de NAT permitidas en los tanques de cultivo de peces son muy variadas, en función de la especie de cultivo. Ebeling *et al.*, (2012), reportan que el límite máximo permitido de nitrógeno amoniacal en el agua usada para acuicultura es de 1mg/L. Sin embargo existen otros reportes donde se cita que concentraciones mayores a 2.3 mg NH<sub>3</sub>/L resultaron ser tóxicas para 32 especies de agua dulce (Eddy, 2005). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal obtenidas en este estudio, sin excepción están por debajo de las concentraciones tóxicas reportadas.

#### **7.1.4. Remoción de materia orgánica**

La remoción de materia orgánica es favorecida por el incremento de la relación C/N del influente (Fu *et al.*, 2010), ya que una relación C/N alta favorece el crecimiento de las bacterias heterótrofas (Ebeling *et al.*, 2006) que son las que se encargan de la remoción de este contaminante. Se ha reportado que la remoción de materia orgánica aumenta al incrementar la relación C/N, de un 91 % de remoción con una relación C/N= 4.5 a 95. 7 % de remoción con una la relación C/N= 13.4 (Fu *et al.*, 2010). En este trabajo, también se encontró que el incremento en la relación C/N, favoreció la remoción de la carga orgánica (Tabla 6.3). La remoción de un contaminante en el agua residual va a estar dada por la estructura de la comunidad en la biopelícula. También se encontró en este trabajo que, con el efluente a base de glucosa, la remoción fue mayor, que con él efluente a base de ácido acético (Tabla 6.3). Lo anterior se debe a que la complejidad del sustrato también va a favorecer una estructura físicamente diferente de la biopelícula, que a su vez puede afectar las tasas de difusión de nutrientes al interior de la biopelícula y por tanto afecta la capacidad de degradación de los contaminantes.

#### **7.2.- Diversidad metabólica de la biopelícula del RLM**

La capacidad metabólica de la biopelícula va a estar dada por las condiciones fisicoquímicas (Nivala *et al.*, 2015) y las condiciones del efluente (Li *et al.*, 2016).

##### **7.2.1. Diversidad metabólica y relaciones C/N**

En este trabajo la actividad metabólica asociada a la degradación de sustratos de carbono en las placas fue mayor en el caso del sustrato más complejo y la relación C/N = 10 (Figura 6.1). Lo anterior se puede explicar por el hecho de que a mayores relaciones C/N, se tienen más materia orgánica disponible. De hecho, la relación C/N corresponde, en términos generales, a la proporción teórica que normalmente requeriría una bacteria de estos nutrientes, dada su composición química teórica y por tanto sus requerimientos

anabólicos (Metcalf y Eddy, 2003). Es normal que un sustrato con esta relación C/N favorezca un mayor desarrollo de las bacterias heterótrofas en la biopelícula (Bassin *et al.*, 2015; Ebeling *et al.*, 2006; Ferrara y Ramírez, 2010; Zhu *et al.*, 2015), que son las que van a usar estas fuentes de carbono orgánico como sustrato. En cambio, dado que la estimación de la actividad en las placas Ecoplate™ corresponde a la actividad de las bacterias heterótrofas y no de las autótrofas y, tomando en cuenta que cuando un reactor biológico es operado con relaciones C/N = 1 las comunidades están estructuradas principalmente por bacterias autótrofas (Bassin *et al.*, 2015; Ebeling *et al.*, 2006), se explica el bajo aprovechamiento de sustratos carbonáceos, con las relaciones C/N = 1, pues el reactor estaría mayoritariamente poblado por bacterias autótrofas que pueden estar realizando un proceso de nitrificación en el RLM, pero no una degradación de la materia orgánica del sustrato suministrado.

### ***7.2.2. Degradación de los sustratos en la placa y su relación con el RLM***

La oxidación de los sustratos en la placa por la comunidad medido como AWCD se ha usado para evaluar el estrés oxidativo que se tiene sobre la comunidad con metales pesados (Gryta y Oszust, 2014), para comparar la capacidad metabólica de degradación de las comunidades presentes en las diferentes capas de un humedal usado en el tratamiento de aguas residuales (Nivala *et al.*, 2015) entre otros trabajos, donde se reporta que entre mayor sea la disponibilidad del sustrato, la comunidad presente en el sistema de tratamiento también tiene una mayor capacidad de degradación de los diversos sustratos orgánicos de las placas. Esto se puede considerar como un incremento en el potencial degradativo de la comunidad bacteriana, dado que aun cuando los sustratos de las placas no son los contaminantes que componen el efluente acuícola, si las bacterias tienen mayor poder metabólico estas van a ser capaces de metabolizar la materia orgánica contenida en ellos. Esta es una capacidad importante ya que la composición de las aguas residuales en general presenta variaciones tanto en concentración, como en composición.

En el caso de la acuicultura estas variaciones pueden estar derivadas del estado fisiológico de los peces de acuerdo a su talla y de las estrategias de alimentación acuícola de acuerdo a la fase de crecimiento de los peces (Ebeling *et al.*, 2006). Por lo tanto, es importante que las comunidades bacterianas tengan esta capacidad de metabolizar otros sustratos orgánicos cuando por alguna razón operativa del RAS haya variaciones en la calidad del efluente acuícola.

La dinámica de degradación por grupo en las placas se vio marcado por iniciar a la hora 24 degradando carbohidratos y polímeros (Figura 6.2) lo cual puede estar dada debido a que la comunidad de la biopelícula del reactor de lecho móvil inoculadas en las placas ECOPLATE iniciaron degradando los sustratos simples para posteriormente degradar los sustratos más complejos.

En esta dinámica de degradación el grupo amino fue mayor en la mayoría de las condiciones experimentales probadas (*i.e.* 1AA, 10AA, 1G y 10G) y en todos los tiempos en los que se estimó la actividad metabólica (*i.e.* 24, 64 y 120 h), aunque este grupo sólo está representado por dos de los 31 sustratos de la placa por lo tanto, el grupos amino representan menos del 7 % de los sustratos de la placa y el sustrato que fue mayormente degradado fue la feniletilamina en las horas 24 y 64. Debido al bajo porcentaje de representación de este grupo se recomienda tener cuidado en la interpretación de los resultados del gremio por grupos (Nivala *et al.*, 2015), además, al hablar de la actividad de degradación de la feniletilamina se debe tener presente que la degradación de ésta comienza con la desaminación por la monoamino oxidasa, que va a liberar el grupo amino dando como resultado el aldehído y el amonio. Por lo tanto, aunque estamos analizando la actividad derivada de un compuesto orgánico que libera amonio el proceso degradativo no está asociado al proceso de oxidación del amonio realizado por bacterias autótrofas en el tratamiento del efluente acuícola, sino más bien en la degradación del compuesto orgánico y en donde el amonio desprendido de la feniletilamina puede coadyuvar a la actividad degradativa de estos pocillos de cultivo en las placas ya que al liberarse se convierte en una fuente de nitrógeno asimilable para las bacterias. Por otro lado se

observó poca o nula degradación de los ácidos carboxílicos en los cultivos en placa, lo que concuerda con otros estudios previos (Nivala *et al.*, 2015; Gryta *et al.*, 2014).

### **7.2.3. Diversidad y equitatividad de Shannon asociados a la capacidad degradativa del RLM**

El mayor índice de Shannon se obtuvo cuando se trabajó con la condición 10G (Figura 6.3). Este resultado confirma que tanto la capacidad de degradación de los sustratos de la placa, como el índice de diversidad de Shannon, dependen de las condiciones experimentales en las que se encontraba la comunidad. Cabe destacar que este índice de diversidad de degradación de sustratos en la placa no puede ser mayor a 3.43 que es cuando se han degradado los 31 sustratos en la placa. El valor de este índice está asociado a la capacidad degradativa de la comunidad y disminuye cuando la comunidad bacteriana está expuesta a sustancias tóxicas (*e.g.* metales pesados) que reducen  $H$  a valores inferiores a la unidad (Gryta *et al.*, 2014).

La equitatividad de Shannon arroja información respecto a la manera de distribución de las abundancias relativas en una comunidad (Magurran, 1988). En el presente estudio se encontró que los valores de equitatividad asociados al consumo de los sustratos, a las diferentes horas evaluadas llegaron a un valor máximo de 0.88 (Tabla 6.11). Estos valores del índice de equitatividad muestran la homogeneidad del potencial degradativo de los sustratos en las placas. Esta homogeneidad indica que para los TRC normales de diseño de un RLM, deberían ser de al menos 7 días (*i.e.* 168 h) (Metcalf y Eddy, 2003), dado que se requiere el crecimiento de bacterias nitrificantes, el reactor tendría una capacidad de adaptación suficientemente amplia para poder degradar compuestos presentes en un cambio de condiciones de operación en el RAS. Los índices de equitatividad de 0.88 se alcanzaron a las 120 h, que serían menores al TRC de diseño del RLM, pero que corresponde a un TRC suficientemente amplio para el desarrollo de una biomasa heterótrofa (Metcalf y Eddy, 2003).

#### **7.2.4. Factores fisicoquímicos que influyeron en la capacidad degradativa**

El comportamiento que se presentó en el perfil metabólico de la comunidad agrupándose por efluentes trabajados y después por grupos se puede deber a la ruta metabólica de los componentes de los efluentes. Este agrupamiento fue incrementando en similitud, con el paso del tiempo. Los factores de operación del reactor que fueron determinantes en este agrupamiento fueron temperatura, pH y concentración de DQO del influente del reactor (Figura 6.7) que como ya se discutió en esta primera parte influyen directamente sobre el tipo de bacterias que conforman la comunidad (*c.f.* subcap 7.1) dando lugar al crecimiento de bacterias autótrofas o heterótrofas de acuerdo con la variación en la concentración de la DQO (Ebeling Timmons, 2012) o afectando de manera directa su capacidad metabólica global por la afectación a las tasas de degradación, en el caso de las variaciones del pH y la temperatura.

Cuando se busca realizar una correlación directa entre los sustratos degradados en las placas ECOPLATE y los contaminantes del reactor, se encuentra que el porcentaje de remoción de la CA estuvo directamente relacionada con la degradación del grupo de las aminas/amidas. Mientras que el porcentaje de remoción de la CO se relacionó de manera directa con la degradación de carbohidratos. Esta relación, está dada por el tipo de microorganismos que son capaces de llevar a cabo la degradación de moléculas de contaminantes de la misma estructura.

Con base en los resultados obtenidos, también se puede afirmar que entre mayor sea la complejidad del efluente (proteínas, alimento sin degradar, productos de desecho de los peces) se puede favorecer el crecimiento de biopelícula que sea capaz de degradar los contaminantes presentes en el efluente y a su vez, tendrá una mayor capacidad de degradación, en virtud de que las bacterias están más adaptadas a metabolizar sustratos más complejos. Esta capacidad de degradación puede mejorar el desempeño del biorreactor, en caso de que exista algún cambio en las características del efluente a tratar, ya que se tendrá un biorreactor con mayor capacidad de resiliencia (Zamora, 2012).

### **7.3.- Estructura de la comunidad de la biopelícula del RLM**

En el estudio de la estructura de la comunidad se encontró que tanto la temperatura como el pH influyeron en la dinámica de la comunidad, así mismo en el estudio de la estructura donde se observó influencia de estos parámetros y no sólo la de la relación C/N y de las fuentes de carbono presentes en el efluente, por lo que será importante tomarlos en cuenta para el diseño y la operación de un RLM en un RAS.

#### **7.3.1. Estructura de la comunidad y relaciones C/N**

En este estudio se encontró que la estructura genética de la comunidad analizada mediante el gen 16S al igual que en el perfil metabólico, se vio afectada directamente tanto por la fuente de carbono, como por la relación C/N del sustrato suministrado. Las relaciones C/N = 10 de ambos efluentes sintéticos presentaron una mayor diversidad de TRFs obtenidos. Lo anterior se puede deber a que a mayor relación C/N favorece el crecimiento de bacterias heterótrofas y debido a que la tasa de crecimiento de éstas es mayor que el de las autótrofas (Ebeling *et al.*, 2006), y esto puede favorecer a su vez el crecimiento de diferentes tipos de filotipos en la biopelícula. Sin embargo, como ya se comprobó con este estudio y algunos otros reportados con anterioridad, cuando la relación C/N es alta, favorece el crecimiento de una mayor cantidad de filos en la biopelícula. Lo cual puede llevar a que la densidad de estos sea mayor y propicie que la biopelícula sea más gruesa (Ebeling y Timmons, 2012) lo cual debido a las condiciones hidrodinámicas del reactor de lecho móvil, haga que se desprenda del medio de soporte (Metcalf y Eddy, 2003) y requiera de un proceso de sedimentación el efluente antes de ser recirculado al sistema RAS (Ebeling *et al.*, 2006). Cabe destacar que el grosor de la biopelícula no solo va a propiciar zonas anóxicas que favorezcan el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (Fu *et al.*, 2010), sino que también esta biopelícula

desprendida puede ser usada como alimento para los propios peces que se estén cultivando, consumiéndose como un biofloc (Crab *et al.*, 2007).

El análisis de la estructura de la comunidad mediante TRFLP revela a las especies más abundantes, por lo tanto la información que brinda sobre la riqueza total es hasta cierto punto parcial ( Zhou, y Brown, 2004). La ausencia de un TRF no confirma la ausencia de una especie (Dickie *et al.*, 2002); más aún, la presencia de un TRF tampoco asegura la existencia de una especie, ya que se ha demostrado la presencia de pseudo-TRFs. Por otro lado, el proceso de estandarización de los datos elimina aquellas señales que se encuentran por debajo de cierto valor de fluorescencia, dejando solo aquellos TRFs que se encuentran altamente representados, lo que podría conducir a eliminar TRFs reales que se encuentran poco representados en la muestra, por encontrarse en el límite de discriminación del método (Dunbar, 2001). Se ha descrito también, que secuencias estrechamente relacionadas presentan diferentes tamaños de TRF y que secuencias de diferentes filos produjeron tamaños de TRF similares (Hartmann y Widmer, 2006). Sin embargo, a pesar de las limitaciones mencionadas que podrían homogenizar los resultados, el TRFLP es una técnica muy poderosa y reproducible, además de que las técnicas moleculares entre ellas el TRFLP son capaces de detectar cambios a nivel fisiológico y así detectar probablemente cambios menores en la estructura de la comunidad (Kirk *et al.*, 2004).

### **7.3.2. Estructura de la comunidad y los procesos de remoción biológica de nitrógeno en el RLM**

En el análisis de la estructura de la comunidad para el gen *beta-amo* relacionado con el proceso de nitrificación (Bustamante *et al.*, 2012) y el gen *nirS* presente en las bacterias encargadas de llevar a cabo el proceso de desnitrificación (Braker y Fesefeldt, 1998; Orlando *et al.*, 2010). Se encontró que la relación C/N de los dos efluentes trabajados fueron determinantes para el número de filotipos (TRFs) encontrados en las muestras.

Las relaciones C/N = 10 favorecieron la presencia de una mayor cantidad de filotipos, pero consecuentemente con una menor densidad relativa (Figura 6.12), sin embargo, las diferencias en cuanto a la presencia de los filotipos de estos dos grupos de bacterias no fueron estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales, lo cual también concuerda con lo analizado en los porcentajes de remoción de CA.

Cuando se analizó el gen *nirS*, se encontró que las relaciones C/N = 1, favorecieron a un mayor número de filotipos, sin embargo, debido a que las concentraciones de oxígeno dentro del reactor eran mayores a 2 mg/L y esto no permitió el establecimiento de zonas anóxicas en la biopelícula, no se pudo llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Ya se había señalado que las relaciones C/N altas favorecen el crecimiento de bacterias heterótrofas, entre ellas las desnitrificantes, sin embargo no hay que perder de vista que no se están analizando todos los microorganismos heterótrofos con este gen, ni tampoco que todos los que se encuentran presentes estén funcionalmente activos para realizar funciones de degradación de contaminantes en el reactor, es por ello que en este caso las relaciones C/N =1 favorecieron un mayor número de filotipos, que seguramente están asociados a la presencia de nitratos en el reactor, aun cuando no pudieron ser reducidos, dadas las condiciones de aireación del RLM y el bajo grosor de la biopelícula. Esto implica que la posible implementación de una etapa anóxica con objeto de desnitrificar en un RLM asociado a un RAS, sería conveniente trabajar con volúmenes aparentes altos de material de soporte que permitiera el crecimiento de más biomasa, para abatir las concentraciones de oxígeno al interior de la biopelícula. También sería importante diseñar los reactores con condiciones hidrodinámicas que permitan el crecimiento de biopelículas gruesas que permitan el establecimiento de zonas anóxicas al interior de la biopelícula y así poder lograr la desnitrificación, trabajando con relaciones C/N bajas.

## VIII. – Conclusiones

- Entre mayor relación C/N se tiene en el efluente a tratar, se tiene una mayor diversidad metabólica, derivada de los cambios que se dan en la estructura de la comunidad en la biopelícula del reactor de lecho móvil.
- Los cambios en la diversidad metabólica y en la estructura de la comunidad bacteriana, derivada la influencia de la relación C/N del efluente a tratar, pueden usarse para orientar los procesos degradativos en el RLM hacia la remoción de determinados contaminantes, en función de las características del efluente.
- En el reactor de lecho móvil se obtuvieron porcentajes de remoción de nitrógeno amoniacal y material orgánica lo suficientemente aceptables para alcanzar un nivel de descontaminación tal en el efluente, que éste podría ser reusado en un RAS.

## IX. – Recomendaciones

- Para el diseño y operación de un RLM acoplado a un RAS:

a).- Si se va a tratar un efluente en el que no se van a tener concentraciones importantes de materia orgánica, ni variabilidad en la composición de esta materia orgánica, se recomienda trabajar con relaciones C/N = 1 en las que se pueda dar un proceso de nitrificación desnitrificación simultánea o bien, establecer una etapa de desnitrificación para asegurar una mayor calidad del agua tratada. Para esto será necesario tener condiciones hidrodinámicas que permitan el crecimiento de una biopelícula gruesa con una capa anóxica y alta densidad celular en el reactor.

b).- Si se va a trabajar con un reactor que esté expuesto a posibles cambios en la composición de la materia orgánica del efluente a tratar, derivado de las condiciones de cultivo, trabajar con relaciones C/N=10 o mayores que permitan el desarrollo de una biopelícula con mayor capacidad degradativa de estos ante las posibles variaciones en el tipo de contaminantes, además de que se puede tener el potencial de que la biopelícula desprendida sea usada como alimento complementario (*i.e.* biofloc) para peces.

c).- Tomar en cuenta las condiciones de pH y temperatura, ya que afectan directamente la capacidad metabólica y genética de la comunidad bacteriana en la biopelícula afectando así la eficiencia de remoción de contaminantes en el reactor.

- Para la investigación:

a).- Continuar con la investigación trabajando con sustratos más complejos, incluyendo los efluentes acuícolas reales.

b).- Estudiar todos los genes funcionales asociados a los procesos de transformación del nitrógeno por otras vías.

c).- Realizar una cuantificación de cada uno de los transcritos funcionales en tiempo real para conocer cuántos genes están activos y son funcionales.

## X.- Referencias

Abzazou, T., Araujo, R. M., Auset, M. y Salvadó, H. (2016). Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Science of the Total Environment*, 541, 1115-1123.

Atlas R. y R. Bartha. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 p

Bassin, J. P., Abbas, B., Vilela, C. L. S., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S. y Dezotti, M. (2015). Tracking the dynamics of heterotrophs and nitrifiers in moving-bed biofilm reactors operated at different COD/N ratios. *Bioresource technology*, 192, 131-141.

Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W. y Top, E. M. (2002). Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 101-112.

Bordebore, C. (2001). Problemas ambientales, problemas humanos. *Sociología Ambiental*, S/N, 321-355

Braker, G., Fesefeldt, A. y Witzel, K. P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3769-3775.

Braun, B., Böckelmann, U., Grohmann, E. y Szewzyk, U. (2010). Bacterial soil communities affected by water-repellency. *Geoderma*, 158(3), 343-351.

Bustamante, M., Verdejo, V., Zúñiga, C., Espinosa, F., Orlando, J. y Carú, M. (2012). Comparison of water availability effect on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in microcosms of a Chilean semiarid soil. *Frontiers in microbiology*, 3, 1–10.

Button, M., Weber, K., Nivala, J., Aubron, T. y Müller, R. A. (2016). Community-level physiological profiling of microbial communities in constructed wetlands: effects of sample preparation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(5), 960-973.

Button, M., Nivala, J., Weber, K. P., Aubron, T. y Müller, R. A. (2015). Microbial community metabolic function in subsurface flow constructed wetlands of different designs. *Ecological Engineering*, 80, 162-171.

Characklis, W. G. y Marshall, K. C. (1990). Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. *Biofilms*, 3.

Chen, W. H., Chen, S. Y., Khanal, S. K. y Sung, S. (2006). Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2170-2178.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P. y Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1), 1-14.

Cuervo-López, F., Martínez-Hernández, S., Texier, A. C., & Gómez, J. (2009). Principles of denitrifying processes. *Environmental technologies to treat nitrogen pollution: principles and engineering*. IWA, London, S/N, 41-65.

Dickie, I. A., Xu, B. y Koide, R. T. (2002). Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist*, 156(3), 527-535.

Dunbar, J., Ticknor, L. O. y Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 190-197.

Ebeling, J. M. y Timmons, M. B. (2012). Recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Production Systems*, 1, 245-277.

Ebeling, J. M., Timmons, M. B. y Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1), 346-358.

Eddy, F. B. (2005). Ammonia in estuaries and effects on fish. *Journal of Fish Biology*, 67(6), 1495-1513.

FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. ISBN: 978-92-5-308276-6. Roma. 253 pp.

Ferrara de Giner, G. (2016). Influencia de la relación C: N en la remoción de nitrógeno usando un sistema combinado de reactores por carga secuencial. *Revista de la Facultad de Ingeniería*, 25(4), 41–51.

Forney, L. J., Zhou, X. y Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 210-220.

Fu, B., Liao, X., Ding, L. y Ren, H. (2010). Characterization of microbial community in an aerobic moving bed biofilm reactor applied for simultaneous nitrification and denitrification. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, 26(11), 1981-1990.

Garland, J. L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 24(4), 289-300.

Garland, J. L., Mills, A. L. y Young, J. S. (2001). Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7), 1059-1066.

González Martínez, S., Maldonado Orozco, L. E. y González Barceló, O. (2002). Tratamiento de aguas residuales utilizando biopelículas sobre un material poroso. In *Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 28 , 1-8.

Gryta, A., Frąc, M. y Oszust, K. (2014). The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(4), 1434-1443.

Hartmann, M. y Widmer, F. (2006). Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7804-7812.

Hashimoto, K., Matsuda, M., Inoue, D. y Ike, M. (2014). Bacterial community dynamics in a full-scale municipal wastewater treatment plant employing conventional activated sludge process. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(1), 64-71.

Hooper, D. U., Solan, M., Symstad, A., Diaz, S., Gessner, M. O., Buchmann, N. y Roy, J. (2002). Species diversity, functional diversity and ecosystem functioning. *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Syntheses and Perspectives*, 17, 195-208.

Jiménez-Montealegre, R., Zamora-Castro, J. y Zúñiga-Calero, G. (2015). Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuaculturales utilizando tapetes microbianos construidos. *Latin american journal of aquatic research*, 43(1), 234-247.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. y Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.

Li, C., Ren, H., Xu, M. y Cao, J. (2015). Study on anaerobic ammonium oxidation process coupled with denitrification microbial fuel cells (MFCs) and its microbial community analysis. *Bioresource technology*, 175, 545-552.

Li, C., Zhang, Z., Li, Y. y Cao, J. (2015). Study on dyeing wastewater treatment at high temperature by MBBR and the thermotolerant mechanism based on its microbial analysis. *Process Biochemistry*, 50(11), 1934-1941.

Li, L., Liu, M., Li, Y., Ma, X., Tang, X. y Li, Z. (2016). Changes in dissolved organic matter composition and metabolic diversity of bacterial community during the degradation of organic matter in swine effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13498-13507.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. y Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 63(11), 4516-4522.

Lüke, C., Speth, D. R., Kox, M. A., Villanueva, L. y Jetten, M. S. (2016). Metagenomic analysis of nitrogen and methane cycling in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *PeerJ*, 4, e1924.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. y Clark, D. P. (2009). *Brock Biología de los microorganismos* (No. 576 MADbE 12a. ed.). Pearson.

Magurran, A. E. (1988). Why diversity? In *Ecological diversity and its measurement* (pp. 1-5). Springer Netherlands.

Masser, M. P., Rakocy, J. y Losordo, T. M. (1999). Recirculating aquaculture tank production systems. *Management of recirculating systems. SRAC Publication*, 452.

McCaig, A. E., Embley, T. M. y Prosser, J. I. (1994). Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiology Letters*, 120(3), 363-367.

Metcalf y Eddy, Burton, F. L., Stensel, H. D. y Tchobanoglous, G. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse*. McGraw Hill. 218 pp.

Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.

Ødegaard, H. (1999). The moving bed biofilm reactor. *Water environmental engineering and reuse of water*, 575314, 205-305.

Orlando, J., Alfaro, M., Bravo, L., Guevara, R. y Carú, M. (2010). Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a “desert bloom” event. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(7), 1183-1188.

Ornelas, D. J., Ruiz, Y. J. y Medina, L. F. (2012). Bacterias Nitrificantes y su Utilidad Para el Tratamiento de Aguas Residuales: Desarrollo de un Enriquecimiento del Inóculo. *Informe Médico*, 14(3), 141-14.

Peralta, R. M., Ahn, C., Voytek, M. A. y Kirshtein, J. D. (2013). Bacterial community structure of nirK-bearing denitrifiers and the development of properties of soils in created mitigation wetlands. *Applied soil ecology*, 70, 70-77.

Pfeiffer, T. J. y Wills, P. S. (2011). Evaluation of three types of structured floating plastic media in moving bed biofilters for total ammonia nitrogen removal in a low salinity hatchery recirculating aquaculture system. *Aquacultural engineering*, 45(2), 51-59.

Reboleiro-Rivas, P., Martín-Pascual, J., Juárez-Jiménez, B., Poyatos, J. M., Vílchez-Vargas, R., Vlaeminck, S. E. y González-López, J. (2015). Nitrogen removal in a moving bed membrane bioreactor for municipal sewage treatment: Community differentiation in attached biofilm and suspended biomass. *Chemical Engineering Journal*, 277, 209-218.

Kumar, V. R., Sukumaran, V., Achuthan, C., Joseph, V., Philip, R. y Singh, I. B. (2013). Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78, 74-81.

Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. y Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4704-4712.

Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y. y Lygren, E. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural engineering*, 34(3), 322-331.

Summerfelt, S. T., Zühlke, A., Kolarevic, J., Reiten, B. K. M., Selset, R., Gutierrez, X. y Terjesen, B. F. (2015). Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors. *Aquacultural Engineering*, 65, 46-54.

Terjesen, B. F., Summerfelt, S. T., Nerland, S., Ulgenes, Y., Fjæra, S. O., Reiten, B. K. M. y Takle, H. (2013). Design, dimensioning, and performance of a research facility for studies on the requirements of fish in RAS environments. *Aquacultural engineering*, 54, 49-63.

Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, Å. y Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS microbiology ecology*, 49(3), 401-417.

Van Kessel, M. A., Harhangi, H. R., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Flik, G., Jetten, M. S. y den Camp, H. J. O. (2010). Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 306(1), 177-184.

Wang, H., Tao, Y., Gao, D., Liu, G., Chen, C., Ren, N. y de Kreuk, M. (2015). Microbial population dynamics in response to increasing loadings of pre-hydrolyzed pig manure in an expanded granular sludge bed. *Water research*, 87, 29-37.

Wang, J., Ni, L., Song, Y., Rhodes, G., Li, J., Huang, Q. y Shen, Q. (2017). Dynamic response of ammonia-oxidizers to four fertilization regimes across a wheat-rice rotation system. *Frontiers in microbiology*, 8, s/p.

Weber, K. P. y Legge, R. L. (2010). Community-level physiological profiling. *Bioremediation: methods and protocols*, s/n, 263-281.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.

Xiang, H., Lu, X., Yin, L., Yang, F., Zhu, G. y Liu, W. (2013). Microbial community characterization, activity analysis and purifying efficiency in a biofilter process. *Journal of Environmental Sciences*, 25(4), 677-687.

Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D. y Tilman, D. (2003). Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology*, 84(8), 2042-2050.

Zamora, A., Malaver, N. y Ramos, J. (2012). Análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biológica Venezuelica*, 32, 1.

Zehr, J. P. y Kudela, R. M. (2011). Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 3, 197-225.

Zhang, S., Wang, Y., He, W., Wu, M., Xing, M., Yang, J. y Pan, M. (2014). Impacts of temperature and nitrifying community on nitrification kinetics in a moving-bed biofilm reactor treating polluted raw water. *Chemical Engineering Journal*, 236, 242-250.

Zhu, S. M., Deng, Y. L., Ruan, Y. J., Guo, X. S., Shi, M. M. y Shen, J. Z. (2015). Biological denitrification using poly (butylene succinate) as carbon source and biofilm carrier for recirculating aquaculture system effluent treatment. *Bioresource technology*, 192, 603-610.

Zhu, S. y Chen, S. (2002). The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering*, 26(4), 221-237.

Zhu, Y., Zhang, Y., Ren, H. Q., Geng, J. J., Xu, K., Huang, H. y Ding, L. L. (2015). Physicochemical characteristics and microbial community evolution of biofilms during the start-up period in a moving bed biofilm reactor. *Bioresource technology*, 180, 345-351.

**Anexo A.- Valores p para la prueba t de Hutchenson, para el índice de Shannon de la diversidad metabólica.**

*Tabla. A.1.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado a la hora 64, para el efluente a base de ácido acético (AA) con las dos*

	<b>T0</b>	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>
T0		0.86979	0.11936	0.70418	0.19423	0.17825	0.19381
1AA1	0.86979		0.72453	0.93782	0.53219	0.63145	0.71387
1AA2	0.11936	0.72453		0.64738	0.75385	0.87827	0.96655
1AA3	0.70418	0.93782	0.64738		0.45502	0.55567	0.64269
10AA1	0.19423	0.53219	0.75385	0.45502		0.88088	0.80978
10AA2	0.17825	0.63145	0.87827	0.55567	0.88088		0.92137
10AA3	0.19381	0.71387	0.96655	0.64269	0.80978	0.92137	

*Tabla. A.2.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado a la hora 64, para el efluente a base de glucosa (G) con las dos relaciones C/N (1 y 10).*

	<b>T0</b>	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
T0		0.27624	0.14302	0.10877	0.46898	0.53721	0.5083
1G1	0.27624		0.88088	0.55989	0.60005	0.55484	0.58163
1G2	0.14302	0.88088		0.89576	0.33178	0.30519	0.32235
1G3	0.10877	0.55989	0.89576		0.26358	0.2417	0.25627
10G1	0.46898	0.60005	0.33178	0.26358		0.92669	0.96495
10G2	0.53721	0.55484	0.30519	0.2417	0.92669		0.96277
10G3	0.5083	0.58163	0.32235	0.25627	0.96495	0.96277	

*Tabla. A.3.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado a la hora 64, para el efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=1*

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>
--	-------------	-------------	-------------	------------	------------	------------

1AA1		0.72453	0.93782	0.33867	0.52739	0.59167
1AA2	0.72453		0.64738	0.47643	0.75503	0.845
1AA3	0.93782	0.64738		0.26737	0.26737	0.50918
1G1	0.33867	0.47643	0.26737		0.65559	0.55989
1G2	0.52739	0.75503	0.26737	0.65559		0.89576
1G3	0.59167	0.845	0.50918	0.55989	0.89576	

*Tabla. A.4.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado a la hora 64, para el efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=10*

	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
10AA1		0.88088	0.80978	0.39356	0.36573	0.38285
10AA2	0.88088		0.92137	0.34239	0.31949	0.33355
10AA3	0.80978	0.92137		0.34008	0.31977	0.33195
10G1	0.39356	0.34239	0.34008		0.92669	0.96495
10G2	0.36573	0.31949	0.31977	0.92669		0.96277
10G3	0.38285	0.33355	0.33195	0.96495	0.96277	

**Anexo B.- Valores *p* para la prueba *t* de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen 16S.**

*Tabla. B.1.-Valores *p* de la prueba de *t* de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen 16S. Efluente a base de ácido acético (AA).*

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>
<b>1AA1</b>		0.96897	0.92331	0.99709	0.92218	0.9664
<b>1AA2</b>	0.96897		0.8899	0.96846	0.95042	0.99515
<b>1AA3</b>	0.92331	0.8899		0.93257	0.84769	0.89349
<b>10AA1</b>	0.99709	0.96846	0.93257		0.9247	0.96588
<b>10AA2</b>	0.92218	0.95042	0.84769	0.9247		0.95816
<b>10AA3</b>	0.9664	0.99515	0.89349	0.96588	0.95816	

*Tabla. B.2.-Valores *p* de la prueba de *t* de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen 16S. Efluente a base de glucosa (G).*

	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>1G1</b>		0.93613	0.9751	0.93218	0.94185	0.96746
<b>1G2</b>	0.93613		0.96161	0.99778	0.99244	0.96689
<b>1G3</b>	0.9751	0.96161		0.95842	0.96804	0.99339
<b>10G1</b>	0.93218	0.99778	0.95842		0.98995	0.96367
<b>10G2</b>	0.94185	0.99244	0.96804	0.98995		0.97367
<b>10G3</b>	0.96746	0.96689	0.99339	0.96367	0.97367	

*Tabla. B.3.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen 16S. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=1*

	<b>1G1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>
<b>1AA1</b>		0.96897	0.92331	0.78137	0.85238	0.81146
<b>1AA2</b>	0.96897		0.8899	0.80572	0.87782	0.83606
<b>1AA3</b>	0.92331	0.8899		0.7092	0.78196	0.74093
<b>1G1</b>	0.78137	0.80572	0.7092		0.93613	0.9751
<b>1G2</b>	0.85238	0.87782	0.78196	0.93613		0.96161
<b>1G3</b>	0.81146	0.83606	0.74093	0.9751	0.96161	

*Tabla. B.4.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen 16S. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=10*

	<b>1G1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>10AA1</b>		0.9247	0.96588	0.85713	0.84677	0.82037
<b>10AA2</b>	0.9247		0.95816	0.92819	0.91765	0.89047
<b>10AA3</b>	0.96588	0.95816		0.88818	0.87764	0.85065
<b>10G1</b>	0.85713	0.92819	0.88818		0.98995	0.96367
<b>10G2</b>	0.84677	0.91765	0.87764	0.98995		0.97367
<b>10G3</b>	0.82037	0.89047	0.85065	0.96367	0.97367	

**Anexo C.- Valores *p* para la prueba *t* de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen *beta-amo*.**

*Tabla. C.1.-Valores *p* de la prueba de *t* de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen *beta-amo*. Efluente a base de ácido acético (AA).*

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>
<b>1AA1</b>		0.83927	0.41528	0.92545	0.86948	0.95417
<b>1AA2</b>	0.83927		0.4832	0.92105	0.96293	0.87677
<b>1AA3</b>	0.41528	0.4832		0.57544	0.56637	0.52782
<b>10AA1</b>	0.92545	0.92105	0.57544		0.96438	0.97431
<b>10AA2</b>	0.86948	0.96293	0.56637	0.96438		0.93545
<b>10AA3</b>	0.95417	0.87677	0.52782	0.97431	0.93545	

*Tabla. C.2.-Valores *p* de la prueba de *t* de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen *beta-amo*. Efluente a base de glucosa (G).*

	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>1G1</b>		0.81838	0.79	0.7509	0.96997	0.88579
<b>1G2</b>	0.81838		0.59339	0.89602	0.78831	0.70394
<b>1G3</b>	0.79	0.59339		0.58458	0.82253	0.91449
<b>10G1</b>	0.7509	0.89602	0.58458		0.72712	0.66147
<b>10G2</b>	0.96997	0.78831	0.82253	0.72712		0.91582
<b>10G3</b>	0.88579	0.70394	0.91449	0.66147	0.91582	

*Tabla. C.3.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen beta-amó. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=1*

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>
<b>1AA1</b>		0.87929	0.52249	0.69488	0.84196	0.52249
<b>1AA2</b>	0.87929		0.59583	0.79715	0.96515	0.59583
<b>1AA3</b>	0.52249	0.59583		0.79	0.59339	1
<b>1G1</b>	0.69488	0.79715	0.79		0.81838	0.79
<b>1G2</b>	0.84196	0.96515	0.59339	0.81838		0.59339
<b>1G3</b>	0.52249	0.59583	1	0.79	0.59339	

*Tabla. C.4.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen beta-amó. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=10*

	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>10AA1</b>		0.96438	0.97431	0.98855	0.72757	0.65848
<b>10AA2</b>	0.96438		0.93545	0.95361	0.7412	0.66419
<b>10AA3</b>	0.97431	0.93545		0.98704	0.68921	0.61771
<b>10G1</b>	0.98855	0.95361	0.98704		0.72712	0.66147
<b>10G2</b>	0.72757	0.7412	0.68921	0.72712		0.91582
<b>10G3</b>	0.65848	0.66419	0.61771	0.66147	0.91582	

**Anexo D.- Valores  $p$  para la prueba  $t$  de Hutchenson, para el índice de Shannon de la estructura de la comunidad gen NirS.**

*Tabla. D.1.-Valores  $p$  de la prueba de  $t$  de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen nirS. Efluente a base de ácido acético (AA).*

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>
<b>1AA1</b>		0.79058	0.86138	0.60286	0.49786	0.69812
<b>1AA2</b>	0.79058		0.91524	0.77918	0.64881	0.90201
<b>1AA3</b>	0.86138	0.91524		0.69193	0.55769	0.81016
<b>10AA1</b>	0.60286	0.77918	0.69193		0.87172	0.86156
<b>10AA2</b>	0.49786	0.64881	0.55769	0.87172		0.71726
<b>10AA3</b>	0.69812	0.90201	0.81016	0.86156	0.71726	

*Tabla. D.2.-Valores  $p$  de la prueba de  $t$  de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen beta-amo. Efluente a base de glucosa (G).*

	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>1G1</b>		0.97695	0.76073	0.68611	0.98191	0.86242
<b>1G2</b>	0.97695		0.73212	0.65517	0.95875	0.83455
<b>1G3</b>	0.76073	0.73212		0.92285	0.78148	0.88143
<b>10G1</b>	0.68611	0.65517	0.92285		0.70789	0.79747
<b>10G2</b>	0.98191	0.95875	0.78148	0.70789		0.88317
<b>10G3</b>	0.86242	0.83455	0.88143	0.79747	0.88317	

Tabla. D.3.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen nirS. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=1

	<b>1AA1</b>	<b>1AA2</b>	<b>1AA3</b>	<b>1G1</b>	<b>1G2</b>	<b>1G3</b>
<b>1AA1</b>		0.79058	0.86138	0.99187	0.98508	0.75065
<b>1AA2</b>	0.79058		0.91524	0.8006	0.77214	0.95251
<b>1AA3</b>	0.86138	0.91524		0.87128	0.84311	0.8678
<b>1G1</b>	0.99187	0.8006	0.87128		0.97695	0.76073
<b>1G2</b>	0.98508	0.77214	0.84311	0.97695		0.73212
<b>1G3</b>	0.75065	0.95251	0.8678	0.76073	0.73212	

Tabla. D.4.-Valores p de la prueba de t de Hutchenson para el índice de Shannon evaluado para el gen nirS. Efluente a base de glucosa (G) y ácido acético (AA) con la relación C/N=10

	<b>10AA1</b>	<b>10AA2</b>	<b>10AA3</b>	<b>10G1</b>	<b>10G2</b>	<b>10G3</b>
<b>10AA1</b>		0.70789	0.79747	0.89527	0.63452	0.70826
<b>10AA2</b>	0.70789		0.88317	0.7552	0.53062	0.57742
<b>10AA3</b>	0.79747	0.88317		0.96625	0.73115	0.82595
<b>10G1</b>	0.89527	0.7552	0.96625		0.70789	0.79747
<b>10G2</b>	0.63452	0.53062	0.73115	0.70789		0.88317
<b>10G3</b>	0.70826	0.57742	0.82595	0.79747	0.88317	