



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular

**Ecología y genómica de poblaciones microbianas en procesos
de biometanogénesis a partir del análisis de metagenomas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Lic. Esteban Orellana

Director de tesis: Dr. Leonardo Erijman

Director adjunto: Dr. Leandro D. Guerrero

Consejero de estudios: Dr. Adrián Turjanski

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor
N. Torres”

Fecha de defensa: 21-02-2022

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2022

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
PUBLICACIONES	8
GLOSARIO	9
INTRODUCCIÓN	11
Residuos urbanos e industriales.....	11
Digestión anaeróbica.....	17
Hidrólisis.....	18
Acidogénesis.....	19
Acetogénesis.....	20
Metanogénesis.....	22
Co-digestión.....	24
Técnicas metagenómicas para el estudio de comunidades microbianas.....	25
Genes marcadores y metagenómica.....	26
Ensamblado de genes.....	28
Ensamblado de genomas en metagenomas.....	30
Análisis de balance de flujos.....	31
Perspectivas de esta tesis.....	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
Objetivo general.....	34
Hipótesis de trabajo.....	34
Objetivos específicos.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Inóculo y sustratos.....	36
Diseño experimental.....	38
Análisis químicos.....	38
Muestreo, extracción de ADN y secuenciación.....	39
Filtrado de calidad de las secuencias.....	39
Ensamblado de secuencias ribosomales 16S.....	39
Ensamblado de los metagenomas y cálculo de la cobertura.....	40
Reconstrucción de genomas a partir de los metagenomas (MAGs).....	41
Asignación taxonómica.....	42
Normalización de datos.....	43
Estudio de la comunidad microbiana a partir de secuencias ribosomales.....	44
Estudio de la estructura microbiana por medio de redes de co-ocurrencia.....	44
Asignación funcional.....	45
Análisis de balance de flujos (ABF).....	45

Reconstrucción de genomas de alta calidad.....	45
Generación de modelos metabólicos.....	47
Modelado a escala de metagenoma.....	48
RESULTADOS	50
Funcionamiento de los reactores.....	50
Diversidad y dinámica de las poblaciones en función de las características del sustrato.....	53
Redes de co-ocurrencias revelan una estructura modular debido al cambio en la composición del alimento.....	57
Reconstrucción de genomas a partir de metagenomas.....	64
Estudio funcional de la comunidad.....	71
El aumento de MAGs hidrolíticos está asociado al cambio de alimentación.....	73
Los compuestos presentes en los residuos de alimento proporcionan nuevos nichos ecológicos.....	78
La metanogénesis depende de un conjunto diverso y dinámico de interacciones sintróficas.....	81
Análisis de balances de flujos.....	83
Diferentes técnicas de ensamblado y binning proporcionan un mayor número de MAGs de alta calidad.....	83
La tasa de crecimiento y la producción de metano sirvieron como controles positivos en la contrastación de los modelos metabólicos.....	84
El uso de diferentes compuestos por los MAGs logró separar las muestras según el tipo de alimentación recibido.....	88
Los flujos metabólicos de los MAGs permitieron agruparlos en nichos de crecimiento.....	91
DISCUSIÓN	99
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	111
APÉNDICE	125

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Leonardo Erijman, por haber confiado en mí para realizar este trabajo, por sus valiosas enseñanzas y su aporte constante que me ayudaron a lo largo del doctorado, por su preocupación para que todo estuviera bien en el trabajo y en lo personal y por su interés en mi progreso.

A mi director asistente, Leandro Guerrero, por brindarme sus conocimientos y su experiencia en microbiología, bioinformática y estadística contribuyendo enormemente a la finalización del trabajo.

A mi novia Sofía por su constante apoyo y amor.

A los miembros del laboratorio que estuvieron siempre presentes.

Al grupo de trabajo de Jorge Muschietti y Agustina Mazzella que crearon un excelente clima de trabajo gracias a sus charlas y tortas de festejos.

A mi familia y amigos que se preocupan y a pesar de la distancia tratan de brindar su ayuda.

A Stefano Campanaro, Laura Treu y todos los miembros de su grupo que me dieron un impulso en la última parte del doctorado y un espacio en su laboratorio para poder seguir avanzando y progresando en mi carrera profesional y personal.

A todos los que trabajan en el INGEBI que prestan su ayuda ante cualquier inconveniente.

A todos los docentes y científicos que día a día aportan sus conocimientos para lograr avanzar como sociedad.

RESUMEN

La degradación de materia orgánica por lodos activados es la tecnología más utilizada para el tratamiento de efluentes municipales e industriales en todo el mundo. No obstante, para lograr una depuración eficiente el proceso requiere grandes cantidades de energía, utilizada principalmente para la oxidación de la materia orgánica por microorganismos aeróbicos. Parte de la energía utilizada puede ser suministrada por el biogás obtenido por la digestión anaeróbica de los lodos excedentes producidos durante el tratamiento aeróbico. Sin embargo, la digestibilidad en estos lodos es baja, por lo que la generación de electricidad a partir del biogás no es suficiente para suplir los requerimientos de una planta de tratamiento.

La adición de residuo de alimentos (RA) como co-sustrato en digestores anaeróbicos de plantas de tratamiento de efluentes es una estrategia que tiene el potencial de convertir las plantas de tratamiento en autosuficientes en el consumo de energía y al mismo tiempo provee un método ambientalmente sustentable de valorización de los residuos orgánicos. Dado que el tipo de sustrato determina la estructura de la comunidad microbiana en los digestores, es crítico entender cómo estas comunidades responden a un cambio en la composición y concentración de sustrato.

El objetivo de este trabajo consiste en entender los mecanismos de adaptación de las comunidades microbianas en digestores anaeróbicos que tratan barros excedentes de plantas de tratamiento de efluentes en co-digestión con residuos de alimentos.

Se estudió la comunidad microbiana en cuatro reactores a escala de laboratorio inoculados con sólidos provenientes de un digestor anaeróbico de una planta de tratamiento municipal (Depuradora Norte AYSA, San Fernando, Buenos Aires), y alimentados diariamente con lodos mixtos (LM) y como co-sustrato se utilizaron cantidades crecientes de RA. El LM consistió en una mezcla de lodo primario y secundario extraída de la misma planta de tratamiento de la cual provenía el inóculo. El RA consistió en una mezcla de productos de origen vegetal (68,4 %) y animal (17,3 %) junto con restos de productos de panificadoras (14,3 %).

Se tomaron muestras durante el periodo de funcionamiento de los reactores, se realizaron extracciones de ADN y su posterior secuenciación masiva al azar. Se ensamblaron los metagenomas y se reconstruyeron 196 genomas a partir de metagenomas (MAG, por su acrónimo en inglés) con una completitud mayor al 50 % y una contaminación menor al 5 %. Independientemente, se reconstruyeron 539 genes de RNA ribosomal 16S con una longitud mayor a 800 pares de bases (pb).

Utilizando análisis de redes, se correlacionó la concentración de RA con la abundancia de los MAGs hidrolíticos y enzimas extracelulares involucradas en la degradación de carbohidratos complejos, que se encuentran comúnmente en la pared celular de plantas. Se resaltó la importancia de uno de los MAGs (*Proteiniphillum*) por ser la única bacteria que codifica la vía completa de degradación de la pectina. Estos resultados sugieren que los cambios en la composición de la materia prima establecen nuevos nichos microbianos para las bacterias con la capacidad de degradar los nuevos sustratos.

De este modo, el trabajo presentado en esta tesis demuestra cómo el cambio de sustrato en los reactores anaeróbicos a escala de laboratorio provoca una alteración en la abundancia y composición de los microorganismos manteniendo estable la función del sistema.

Palabras claves: digestión anaeróbica, residuo de alimento, lodos activados, metagenómica, plantas de tratamiento municipal, economía circular

ABSTRACT

Ecology and genomics of microbial populations in bio-metanogenesis processes from the analysis of metagenomes

The degradation of organic matter by activated sludge is the most used technology for the treatment of municipal and industrial effluents around the world. However, to achieve efficient purification the process requires large amounts of energy, used mainly for the oxidation of organic matter. Part of the energy used can be supplied by the biogas obtained by the anaerobic digestion of the excess sludge produced in the aerobic treatment. However, the digestibility of the sludge is low, getting not enough electricity from the biogas in order to meet the requirements of a treatment plant.

The addition of food waste (FW) as a co-substrate in anaerobic digesters of effluent treatment plants is a strategy that has the potential to make treatment plants self-sufficient in energy consumption and at the same time provides an environmentally sustainable method to recover organic waste. Since the type of substrate determines the phylogenetic structure of the microbial community in digesters, it is important to understand how these communities respond to a change in substrate composition and concentration.

The objective of this work is to understand the adaptation mechanisms of microbial communities in anaerobic digesters that handle excess sludge from wastewater treatment plants (WWTP) in co-digestion with food waste.

The microbial community was studied in 4 laboratory-scale reactors inoculated with solids from an anaerobic digester of a municipal WWTP (Planta Norte AYSA, San Fernando, Buenos Aires), and fed daily with sewage sludge (SS) and as co-substrate increasing amounts of FW were used. The SS consisted of a mixture of primary and secondary sludge extracted from the same WWTP from which the inoculum was used. The FW that was used consisted of a mixture between

vegetable products (68.4%) and animal origin (17.3%) together with remains of bakery products (14.3%), prepared in the laboratory.

Samples were taken throughout the operation of the reactors, DNA extraction and subsequent massive random sequencing were carried out. With the data obtained, the microbial community was studied at the taxonomic level using ribosomal sequences and metagenomes were assembled. Thanks to the difference in coverage, 196 metagenome assembled genomes (MAGs) were reconstructed with a completeness greater than 50% and a contamination less than 5%. Besides, 539 16S ribosomal RNA genes with a length greater than 800 base pairs (bp) were reconstructed.

Using network analysis, the concentration of FW was correlated with the abundance of hydrolytic MAGs and extracellular enzymes involved in the degradation of complex carbohydrates, which are commonly found in the cell wall of fruits and plants. The importance of one of the MAGs (*Proteiniphillum*) was highlighted, as it is the only bacterium that encodes the complete pectin degradation pathway. These results suggest that changes in the composition of the raw material establish new microbial niches for bacteria with the ability to degrade new substrates.

In this way, the work presented in this thesis demonstrates how the change of substrate in anaerobic reactors on a laboratory scale causes an alteration in the abundance and composition of microorganisms, keeping the function of the system stable.

Keywords: anaerobic digestion, food waste, sewage, metagenomics, wastewater treatment plant, circular economy

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

- Esteban Orellana, Carol Davies-Sala, Leandro D. Guerrero, Ignacio Vardé, Melisa Altina, María Cielo Lorenzo, Eva L. Figuerola, Rodrigo M. Pontiggia, Leonardo Erijman, 2019. Microbiome network analysis of co-occurrence patterns in anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste. *Water Sci Technol* 79 (10): 1956–1965. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.194>
- Esteban Orellana, Leandro D. Guerrero, Carol Davies-Sala, Melisa Altina, Rodrigo M. Pontiggia, Leonardo Erijman, 2022. Extracellular hydrolytic potential drives microbiome shifts during anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste, *Bioresource Technology*, 343, 126102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126102>.

Además, las técnicas utilizadas se emplearon en las siguientes publicaciones

- María Victoria Pérez, Leandro D. Guerrero, Esteban Orellana, Eva L. Figuerola, Leonardo Erijman, 2019. Time Series Genome-Centric Analysis Unveils Bacterial Response to Operational Disturbance in Activated Sludge. *mSystems* e00169-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00169-19>
- Leandro D. Guerrero, María Victoria Pérez, Esteban Orellana, Mariana Piuri, Cecilia Quiroga, Leonardo Erijman, 2021. Long-run bacteria-phage coexistence dynamics under natural habitat conditions in an environmental biotechnology system. *The ISME Journal* 15, 636–648. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00802-z>

GLOSARIO

AA	Enzima auxiliar
ABF	Análisis de balance de flujo
AGV	Ácido graso volátil
ARNr 16S	Gen de ARN ribosomal 16S
CABA	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
CAZyma	Enzima activa sobre carbohidrato
CCA	Análisis de correlación canónico
CE	Esterasa de carbohidratos
DA	Digestión anaeróbica
FORSU	Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos
GH	Glicosil hidrolasa
GSMM	Modelos metabólicos a escala genómica
GT	Glucosiltransferasa
LM	Lodos mixtos
MAG	Genoma ensamblado a partir de metagenoma
mcr	Metil-coenzima M reductasa

PCA	Análisis de coordenadas principales
PL	Liasa de polisacáridos
PLTC	Planta de tratamiento de líquidos cloacales
RA	Residuo de alimento
RS	Relleno sanitario
SAOB	Bacterias sintróficas oxidadores de acetato

INTRODUCCIÓN

Residuos urbanos e industriales

Las actividades humanas cotidianas generan residuos urbanos líquidos y sólidos que deben ser tratados adecuadamente para evitar problemas en la salud humana y en el ambiente. El uso del agua en diferentes actividades antropogénicas altera su calidad, dificultando su aplicación para otros posibles usos. Las aguas cloacales urbanas están compuestas por una mezcla compleja de materia orgánica e inorgánica. El líquido cloacal es un vehículo de dispersión de compuestos y microorganismos que son peligrosos tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Por otra parte, el consumo de la materia orgánica produce la depleción de oxígeno de los cuerpos receptores. El exceso de nutrientes como nitrógeno y fósforo puede provocar eutrofización, lo que puede ocasionar el excesivo crecimiento de algas y plantas, alterando así también la disponibilidad de oxígeno disuelto para los organismos acuáticos (Grady *et al.*, 2011).

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) conjuntamente con el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) se vierten en promedio 2,6 millones de m³ de residuos líquidos por día. La depuradora Norte Aysa (ubicada en San Fernando, Provincia de Buenos Aires, Argentina) trata 156 mil m³/día de líquidos cloacales antes de verterlos en el río Reconquista (Provincia de Buenos Aires, Argentina).

Es una típica planta de tratamiento de líquidos cloacales (PTLC), que remueve la materia contaminante por medio de pasos sucesivos en donde intervienen procesos físicos y biológicos. En una primera etapa, el tratamiento preliminar logra separar los sólidos gruesos por sistemas de rejas y desarenadores. Al finalizar esta etapa los

sólidos sedimentables son separados físicamente del líquido por gravedad en sedimentadores primarios dando a lugar a los **lodos primarios** (Figura 1).

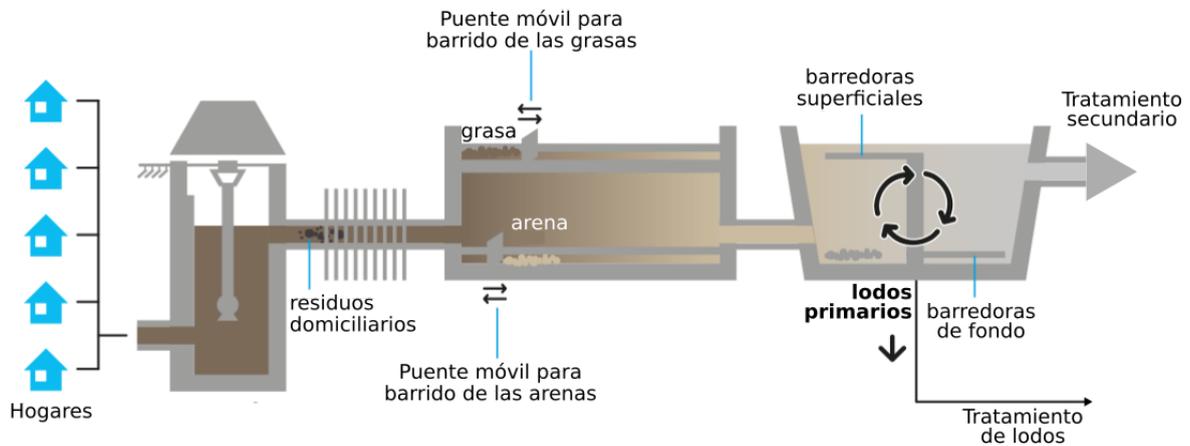


Figura 1: Esquema del tratamiento primario de una planta de tratamiento municipal (modificado de www.aysa.com.ar). La remoción de partículas de gran tamaño, grasa y desarenación depende de los residuos que llegan a la planta de tratamiento de líquidos cloacales. Los lodos que se obtienen en este tratamiento se denominan **lodos primarios**.

El líquido resultante ingresa al tratamiento biológico o tratamiento secundario. La tecnología más utilizada para el tratamiento de líquidos cloacales es la de lodos activados y su uso ha sido aplicado mundialmente con éxito por más de 100 años (Jenkins y Wanner, 2014). Se trata de un sistema de tratamiento biológico en el que los microorganismos se encuentran suspendidos en un tanque aireado. Las comunidades de microorganismos, constituidas por un variado número de taxones bacterianos, oxidan la materia orgánica biodegradable transformándola en CO_2 y H_2O . La biomasa crece en forma de agregados microbianos llamados floc (Johnke *et al.*, 2014). La oxigenación se realiza por inyección de aire (en otros casos mediante agitación mecánica) y la densidad microbiana se mantiene a altos niveles por recirculación de lodos activados que se separan por gravedad del líquido tratado en los sedimentadores secundarios. El proceso reduce más del 95 % de la demanda

de oxígeno, por lo que el líquido tratado puede ser descargado en forma segura a un cuerpo receptor de agua (Figura 2).

En este proceso se produce el crecimiento de microorganismos, que utilizan la materia orgánica presente en el líquido cloacal como fuente de carbono y energía. Esta biomasa excedente, denominada **lodos secundarios**, debe eliminarse del sistema y disponerse adecuadamente.

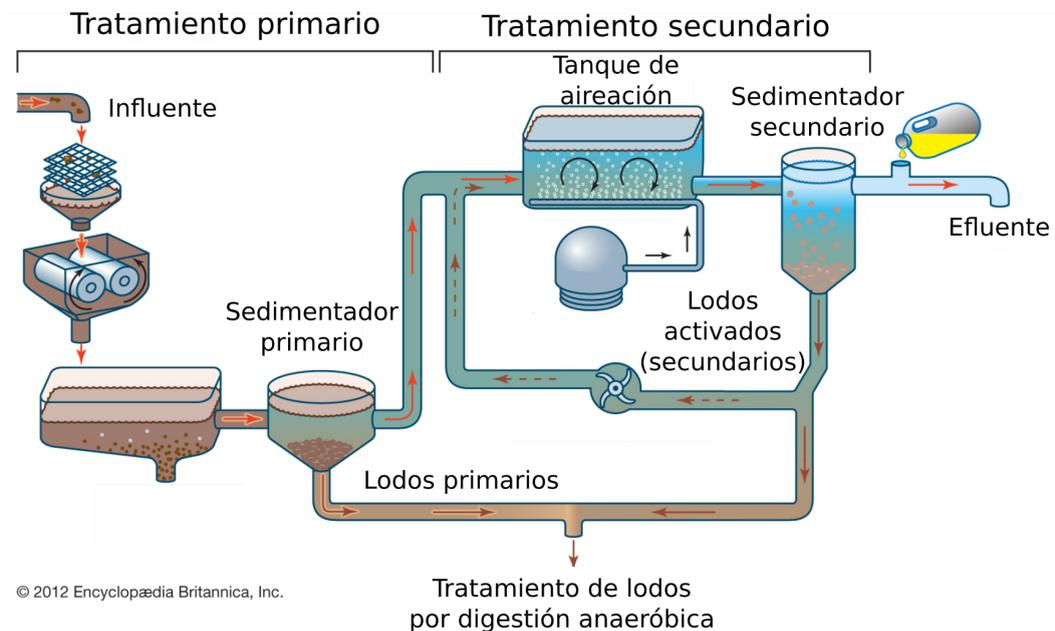


Figura 2: Esquema de una planta de tratamiento municipal. El agua que es tratada es descargada a aguas receptoras, mientras que los excedentes, los lodos primarios y secundarios (lodos mixtos), son recolectados para un tratamiento posterior (digestión anaeróbica).

Tanto los lodos primarios como los secundarios pueden ser digeridos anaeróticamente con el fin de lograr un producto estabilizado y a la vez obtener biogás. Con el fin de reducir el agua que contienen, los lodos primarios se espesan por gravedad una vez tamizados, mientras que los lodos secundarios se concentran mediante flotación con aire disuelto. Luego se mezclan en una cámara, llamada cámara de lodos mixtos, y son enviados al digester anaeróbico (Figura 3).

En el digestor anaeróbico, una comunidad microbiana degrada la materia orgánica presente, produciendo dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) como productos principales, estabilizando de esta manera el sustrato. El biogás producido (cuando no hay posibilidad de co-generación) se utiliza para mantener al digestor a una temperatura mesofílica y el resto se almacena en un gasómetro. El digestato que resulta de la digestión anaeróbica (DA) se deshidrata y en muchos casos se hace una disposición final en *landfarming*. Una alternativa más sustentable para el producto de la DA es utilizarlo como fertilizante, pudiendo satisfacer parcialmente la demanda de fertilizantes orgánicos sintéticos y proporcionar micronutrientes al suelo (Pecorini *et al.*, 2020). Sin embargo, actualmente las regulaciones no permiten el uso del digestato proveniente de plantas de tratamiento municipal si contienen contaminantes orgánicos y metales pesados por encima de valores límites.

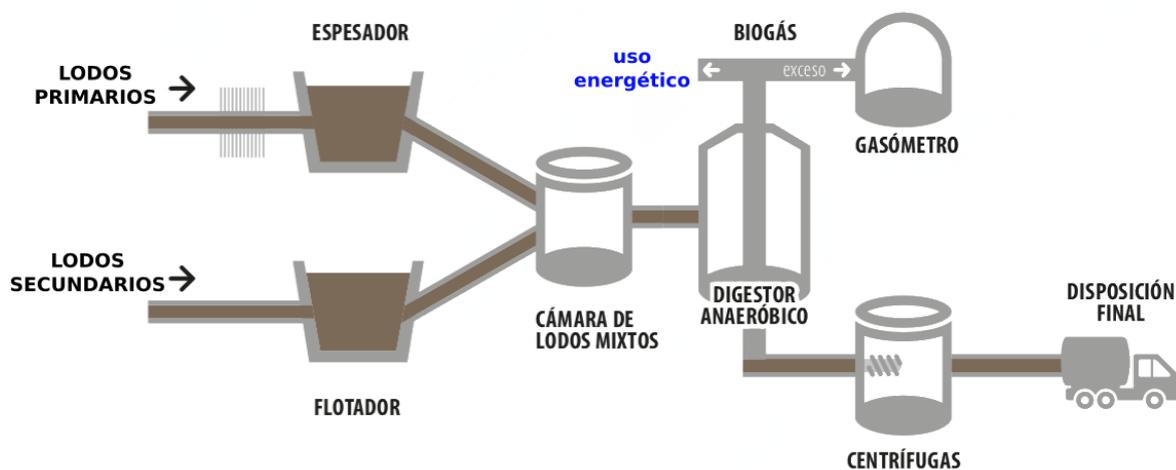


Figura 3: Esquema de la línea de tratamiento de lodos primarios y secundarios (adaptado de www.aysa.com.ar). Luego de la digestión anaeróbica de lodos mixtos puede utilizarse como fertilizante o ser tratado en *landfarming*.

Si bien el proceso de lodos activados es una tecnología consolidada mundialmente, su sostenibilidad ambiental está siendo cuestionada por la gran cantidad de energía que consume y por el problema que acarrea la generación de grandes cantidades

de lodos excedentes. Se estima que entre el 40 % y el 50 % de la energía utilizada en una planta de tratamiento municipal está destinada solamente a la etapa biológica de la oxidación de materia orgánica del efluente (Guo *et al.*, 2014). En promedio, una planta de tratamiento consume 0,62-0,87 kWh/m³ (Dai *et al.*, 2013; Shoener *et al.*, 2014), por lo que en una planta estándar, con una capacidad para 600.000 habitantes se consumen aproximadamente 115.862,4 kWh por día, equivalente al consumo diario de 4.000 hogares.

Una forma de cubrir la demanda energética del proceso de barros activados es utilizar el biogás producido en la digestión anaeróbica de lodos mixtos para producir energía eléctrica. Sin embargo, la cantidad de biogás producido por digestión de lodos mixtos generalmente no es suficiente para suplir la totalidad de la demanda energética que requiere una planta de tratamiento (McCarty *et al.*, 2011). Una de las razones por la que no se genera suficiente metano se debe a que la eficiencia de conversión se encuentra limitada porque la materia orgánica en dichos sistemas, mayormente compuesto por células microbianas provenientes de las cámaras de aireación, no llega a ser totalmente hidrolizada por las enzimas microbianas en el digestor. Además, los lodos mixtos tienen la característica de poseer un bajo contenido carbono/nitrógeno (C/N), lo que puede ocasionar una acumulación de amoníaco que puede llegar a ser inhibitorio para las arqueas metanogénicas (Banks y Heaven, 2013).

Otro de los grandes problemas que enfrenta la sociedad actual es la acumulación de residuos urbanos. En Argentina se generan 45.000 toneladas diarias de residuos, lo cual representa aproximadamente 1,15 kg diarios de residuos por habitante (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable). La mitad de los residuos sólidos

urbanos (aproximadamente el 43 %) son orgánicos. La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), así como los residuos orgánicos industriales, poseen una alta capacidad energética. Sin embargo, actualmente este material se descarta como residuo, ocupando grandes volúmenes de los rellenos sanitarios (RS). Los rellenos sanitarios son terrenos previamente preparados para evitar filtraciones y poseen un sistema de recogida de lixiviado. El relleno sanitario es una tecnología utilizada globalmente, que trata el 45 % de los desechos generados (Kaza *et al.*, 2018). La base de cada módulo del RS se impermeabiliza colocando tres capas de materiales. Se coloca arcilla en el suelo, seguida de una membrana de polietileno de alta densidad y finaliza con un suelo vegetal para cubrir y proteger la membrana. Luego, por arriba de las capas impermeabilizantes, se coloca un sistema de cañerías con el fin de coleccionar los líquidos que se producen durante la descomposición de la parte orgánica de los residuos y conducirlos a tratamientos posteriores. La deposición de la materia se realiza en celdas, que son sectores dentro de cada módulo del RS. Se vuelcan los residuos, se distribuyen y se compactan para aprovechar el espacio y lograr estabilidad en el terreno. Cuando se llega al volumen total para el que fue planificado el módulo, comienza la etapa de cierre que consiste en la colocación de cañerías para la extracción del biogás y se coloca una cobertura final con suelo vegetal. De esta manera, en este ambiente la comunidad microbiana es capaz de degradar la materia orgánica y un porcentaje del biogás liberado puede ser recogido por el sistema de cañerías, que lo conducen hasta una planta de generación eléctrica, mitigando parcialmente el efecto de emisión de contaminantes al medio ambiente y aprovechando el metano como fuente de energía. Sin embargo, una fracción significativa del biogás generado no es coleccionado eficientemente y se produce migración lateral hacia la atmósfera.

Además, una vez cerrado un relleno sanitario, la producción de biogás continúa por muchos años (Börjesson *et al.*, 2004), aún cuando ya no es factible su recuperación (Scheutz *et al.*, 2009). Por este motivo, con el propósito de disminuir las emisiones de contaminantes al ambiente, la mayoría de los países del norte de Europa prohíben el ingreso de materia orgánica a los rellenos sanitarios (Brennan *et al.*, 2016)

Una solución más sustentable es combinar la materia orgánica con los lodos mixtos de las plantas de tratamiento de efluentes, proveyendo un sustrato con mayor capacidad biodegradable para la co-digestión anaeróbica, mejorando la eficiencia de conversión de materia orgánica a CH₄ (Fernando-Foncillas *et al.*, 2021; Mehariya *et al.*, 2018). El objetivo es además lograr un digestato estabilizado que pueda ser utilizado como fertilizante, de modo de cerrar el círculo de reuso y valorización de los residuos.

Digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica es el proceso de degradación de materia orgánica por medio de microorganismos en ausencia de oxígeno, teniendo como productos principales el dióxido de carbono y metano. Para lograr la degradación de materia orgánica, diferentes gremios microbianos interactúan mediante un proceso secuencial y concertado (De Vrieze *et al.*, 2016). Los diferentes procesos involucrados son la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 4).

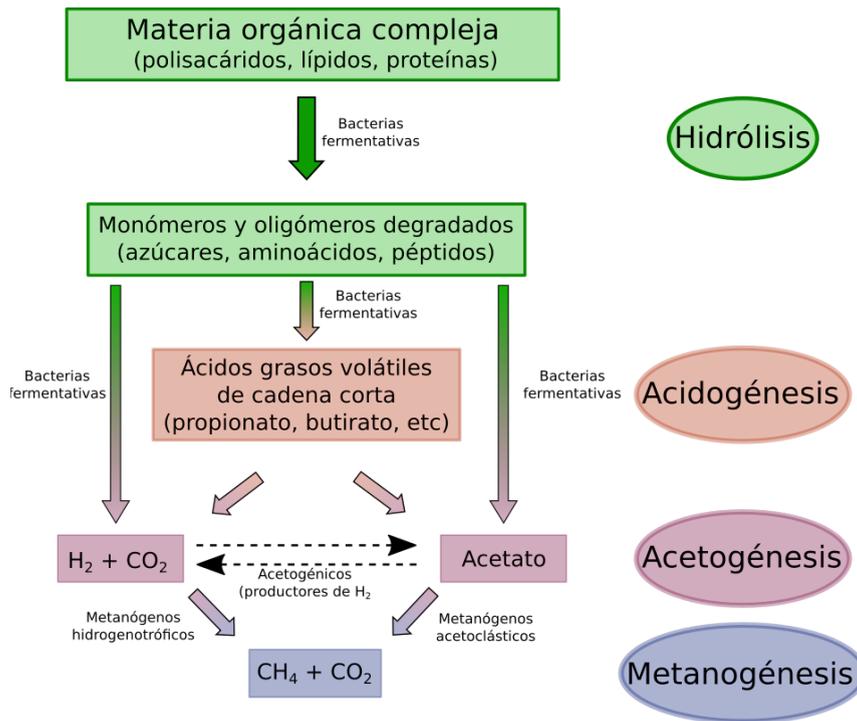


Figura 4: Representación esquemática de la digestión anaeróbica. Los diferentes gremios que se encargan de degradar la materia orgánica han recibido un color diferente mencionando los principales productos.

Hidrólisis

En la fase inicial del proceso de digestión anaeróbica, biopolímeros como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos de gran tamaño son despolimerizados a sus unidades estructurales, tales como ácidos grasos de cadena larga (como por ejemplo los ácidos esteárico, palmítico y oleico), oligopéptidos, aminoácidos, monosacáridos (como la glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, entre otros), glicerina y compuestos nitrogenados. Las bacterias hidrolíticas secretan enzimas (hidrolasas), comúnmente lipasas, proteasas, celulasas, amilasas, xilanasas y pectinasas, entre otras, que son capaces de romper las uniones en los polímeros y de esta manera liberar monómeros que pueden ingresar a la célula.

La hidrólisis puede llegar a ser un cuello de botella del proceso, en el caso de que el alimento provisto al reactor sea biomasa recalcitrante, o puede resultar un paso muy

rápido si el sustrato es fácilmente degradable (Ge *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2003). Las bacterias de los filos Bacteroidota y Firmicutes son comúnmente las responsables de llevar a cabo esta etapa (Campanaro *et al.*, 2018; Svartström *et al.*, 2017; Vanwonterghem *et al.*, 2016). Las enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymas del inglés *carbohydrate active enzymes*) son un conjunto de proteínas relacionadas con la degradación, modificación o síntesis de enlaces glicosídicos. Las bacterias hidrolíticas secretan al medio extracelular este tipo de enzimas, en su mayoría las glicosidasas hidrolíticas (GHs), las cuales remueven los enlaces glicosídicos de los polímeros. Las esterasas de carbohidrato (CEs), liasas de polisacáridos (PLs) y enzimas auxiliares (AAs) son también liberadas por las bacterias hidrolíticas, permitiendo degradar diferentes polímeros y de esta forma los monómeros son capaces de entrar a las células (Álvarez *et al.*, 2016; Lombard *et al.*, 2014). Las CAZymas han sido descritas mayormente en los filos Bacteroidota y Firmicutes (Campanaro *et al.*, 2018). Los genes que codifican a estas enzimas pueden ser expresadas en el genoma de la bacteria o pueden formar operones de genes co-expresadas, como por ejemplo en loci de utilización de polisacáridos en el caso de Bacteroidota o celulosomas en Firmicutes (Kougias *et al.*, 2018).

Acidogénesis

Los compuestos liberados por la acción de las bacterias hidrolíticas son absorbidos por bacterias, que los fermentan produciendo ácidos grasos volátiles (AGVs), en la etapa conocida como acidogénesis. Existen diversos caminos metabólicos en la degradación de los AGVs. El piruvato suele ser el intermediario más común, actuando como aceptor interno de electrones en la oxidación de NADH y produciendo de esta manera compuestos de 2 a 6 carbonos como el acetato,

propionato, lactato, butirato valerato y caproato, y en algunos casos formato e hidrógeno (Sikora et al., 2017). En el caso de la acidogénesis de aminoácidos, el grupo amino es liberado como amoníaco y el azufre de la cisteína y metionina producen sulfuro. Existen dos caminos diferentes en la degradación de aminoácidos, en una de ellas un par de aminoácidos son degradados por una reacción acoplada de oxidación/reducción en la reacción de Stickland, en la cual uno de ellos actúa como donador de electrones y el otro como aceptor de electrones. Sin embargo, si la presión parcial de hidrógeno es suficientemente baja, la fermentación de aminoácidos puede suceder a través de un camino metabólico en el que hay una liberación de electrones a través de hidrógeno (Ramsay y Pullammanappallil, 2001). Las bacterias fermentativas que se encuentran en reactores anaerobios cumpliendo estas funciones son de los filos Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria, Chloroflexota y Actinobacteriota (Guo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020; Patil *et al.*, 2021).

En términos de la estabilidad del proceso, la acidogénesis es una etapa crucial, ya que la mayoría de los productos generados son ácidos que disminuyen el pH del reactor. La acidificación del digestor es uno de los mayores problemas para la microbiota, llevando generalmente a un mal funcionamiento o incluso la parada completa del proceso (Lopes *et al.*, 2007).

Acetogénesis

La degradación de oligómeros y monómeros puede ser realizada por fermentadores secundarios en la etapa de acetogénesis. Los ácidos grasos volátiles generados en la acidogénesis son utilizados por bacterias acetogénicas. A su vez, los productos generados en esta etapa son utilizados como sustratos para los metanógenos en

la metanogénesis, provocando de esta manera que estas dos últimas etapas de la digestión anaeróbica están fuertemente conectadas.

Debido al limitado número de sustratos involucrados en las vías metanogénicas, los metanógenos son estrictamente dependientes de las bacterias que producen dichos sustratos, y se relacionan a menudo por vías sintróficas. La sintrofia es un tipo especial de cooperación simbiótica entre dos organismos con capacidades metabólicas diferentes, en la cual la producción de compuestos por un miembro microbiano, a través de reacciones químicas energéticamente desfavorables, es utilizada para el crecimiento de otros organismos, logrando de esta manera que las reacciones puedan realizarse.

Los diferentes caminos metabólicos utilizados en las vías sintróficas de compuestos comúnmente encontrados en la digestión anaeróbica incluyen a la beta-oxidación en la oxidación del butirato, Wood-Ljungdahl en la conversión de acetato a dióxido de carbono e hidrógeno, el camino metabólico de metilmalonil-CoA en la utilización del propionato y la degradación de etanol en ausencia de aceptores de electrones (Figura 5) (Kamagata, 2015; McInerney y Bryant, 1981). Las bacterias especializadas en la oxidación de los diferentes compuestos mencionados en sintrofia con metanógenos se encuentran en su mayoría dentro del orden *Clostridiales* (Hatamoto *et al.*, 2008; Westerholm *et al.*, 2010) y la familia *Thermotogaceae* (Balk *et al.*, 2002). En el caso de la oxidación de butirato y propionato, diferentes bacterias del género *Syntrophus*, *Syntrophobacter*, *Syntrophothermus* y *Pelotomaculum* cumplen esta función en diferentes reactores anaeróbicos (Worm *et al.*, 2014). Mientras que en la oxidación de acetato se han descrito diferentes bacterias sintróficas, incluyendo *Clostridium ultunense* (Schnürer *et al.*, 1996), *Thermacetogenium phaeum* (Hattori *et al.*, 2000), *Pseudothermotoga*

lettingae (Balk *et al.*, 2002), *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm *et al.*, 2010) y *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm *et al.*, 2011).

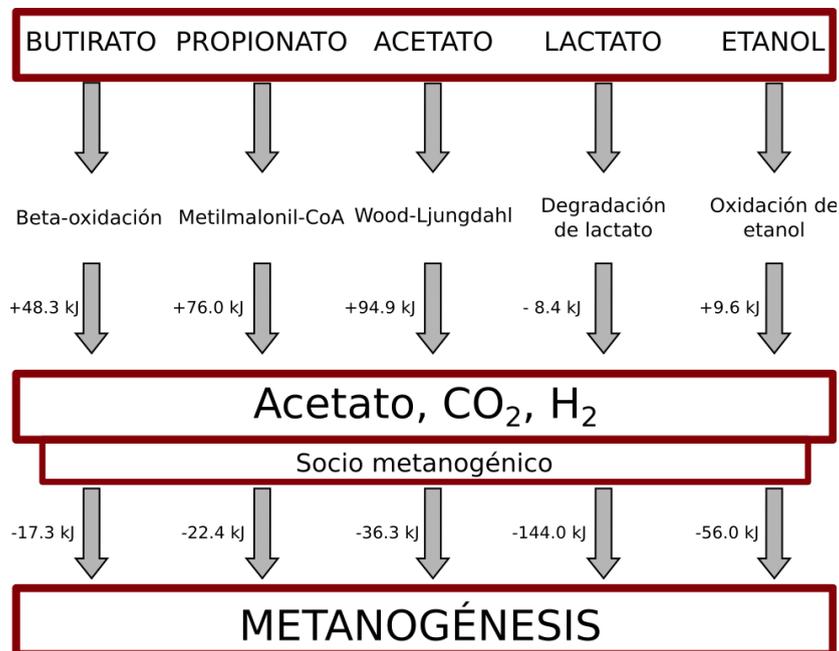


Figura 5: Metabolismo sintrófico durante la oxidación de productos no gaseosos de la acidogénesis basado en la sintrofia con metanógenos consumidores de hidrógeno. Figura adaptada de Sikora *et al.* (2015).

Hay además numerosos miembros de diferentes comunidades microbianas de digestores anaeróbicos que no han podido ser caracterizados funcionalmente y se cree que podrían cumplir funciones sintróficas oxidando diferentes compuestos además de los ya mencionados, como por ejemplo, la fermentación de aminoácidos.

Metanogénesis

La última etapa, y la más importante de la digestión anaeróbica, es la formación de metano y dióxido de carbono. La metanogénesis es un proceso de respiración celular anaeróbico en el que el gradiente electroquímico es realizado en la membrana celular. Gracias al gradiente de protón/ion generado por la fuerza

protón-motriz, las enzimas de ATP sintasas ubicadas en la membrana sintetizan ATP. Este proceso requiere de enzimas y cofactores específicos que solo se encuentran en arqueas metanogénicas. Estos organismos son anaerobios estrictos. En la utilización de los diferentes sustratos comparten una enzima clave en la generación de metano, la metil-coenzima M reductasa (mcr), la cual cataliza el último paso de la formación de metano. Si bien todos los metanógenos generan metano, no todos lo hacen a partir del mismo sustrato. Las principales arqueas metanogénicas son clasificadas en hidrogenotróficas, acetoclásticas y metilotróficas. Durante la metanogénesis hidrogenotrófica, el CO_2 es reducido a CH_4 , utilizando H_2 o formiato como donores de electrones en la mayoría de los casos. En la metanogénesis acetoclástica, la producción de CH_4 y CO_2 se realiza a partir de acetato y es la vía más abundante en fuentes naturales (Fournier, 2009). Se conocen hasta el momento solamente dos géneros (*Methanotherix* y *Methanosarcina*) capaces de realizar la conversión de acetato a CH_4 (Amin *et al.*, 2021). Los metilotrofos son metanógenos que producen CH_4 a partir de compuestos metilados, tales como metanol, metil-aminas, dimetilsulfuro y metanotiol (Deppenmeier *et al.*, 2002).

La vía metanogénica predominante depende de diferentes factores en el digestor anaeróbico, tales como el pH y la temperatura, como así también de la concentración de amonio, ácido sulfúrico o ácidos grasos volátiles (Poirier *et al.*, 2016; Westerholm *et al.*, 2016). Dependiendo de qué vía es la predominante en el sistema bajo las condiciones en las que se encuentra, el acetato puede ser formado a partir de CO_2 e H_2 por homoacetógenos, o el acetato puede ser convertido a CO_2 e H_2 por bacterias sintróficas oxidadoras de acetato (del inglés SAOB - syntrophic

acetate oxidizing bacteria). En este último caso, las SAOB necesitan de la arquea metanogénica que consume H_2 (metanogénicos hidrogenotróficos).

Co-digestión

La co-digestión con co-sustratos orgánicos se puede utilizar para aumentar la producción de biogás a partir de barros excedentes, cumpliendo idealmente con las demandas energéticas del tratamiento de aguas residuales (Mo y Zhang, 2013). Los residuos orgánicos (llamados a partir de ahora residuos de alimentos - RA) cumplen los criterios de ser un co-sustrato adecuado para aumentar la producción de energía. Además, utilizar los residuos alimenticios para co-digestión es una opción más sustentable que el tratamiento en rellenos sanitarios, con el que no se logra aprovechar toda la energía potencial de este sustrato, además de que parte del metano liberado no es captado por el sistema de cañerías, contribuyendo así a la emisión antropogénica de gases de efecto invernadero (Karthikeyan *et al.*, 2018).

Sin embargo, la co-digestión de los residuos de alimentos con lodos mixtos podría ser más desafiante que la mono-digestión de lodos en una PTLCs en lo que respecta a la gestión operativa del proceso anaeróbico. Una carga elevada de materia orgánica fácilmente biodegradable puede conducir a la rápida acumulación de ácidos grasos volátiles, provocando la acidificación del digestor y, por lo tanto, la interrupción de la acción concertada de los diversos grupos de microorganismos implicados en la producción de biogás (Carballa *et al.*, 2015). Una alta carga de grasas y aceites también podría inhibir los organismos sintróficos y metanógenos (Amha *et al.*, 2017).

El tipo de sustrato es uno de los principales impulsores de las variaciones en la estructura filogenética de las comunidades microbianas (Ibarbalz *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Estudios anteriores han demostrado que las comunidades microbianas en los digestores de lodos activados responden a los cambios en la composición y concentración del sustrato (Patil *et al.*, 2021). La adición de co-sustratos ricos en carbono provoca cambios sustanciales en la composición de la comunidad y una reducción de la diversidad (Nguyen *et al.*, 2018). La microbiota de digestores anaeróbicos de lodos cambia significativamente cuando se co-digiere con los residuos de alimentos. En comparación con la mono-digestión, en los estudios de co-digestión se encontró un aumento en la proporción de miembros de *Bacteroides* y *Methanosphaera* (Tonanzi *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016) y en la abundancia de bacterias capaces de degradar polímeros orgánicos complejos, como *Thermotogales*, *Thermonema* y *Lactobacillus* (Fitamo *et al.*, 2017). Otros estudios encontraron *Syntrophomonas* y *Methanosarcina* como géneros dominantes en digestores enriquecidos con RA (Kim *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2017; Ziels *et al.*, 2015).

Técnicas metagenómicas para el estudio de comunidades microbianas

La historia de la microbiología ha estado signada por el aislamiento de diferentes organismos y su caracterización fenotípica y genética. Existen numerosas diferencias entre los diversos organismos que componen una comunidad microbiana, y los avances biotecnológicos han permitido revelar que es posible utilizar el metabolismo de alguno de ellos para la producción de antibióticos, vacunas, entre otros. El cultivo, aislamiento y descripción de microorganismos ha sido esencial para descifrar las características de las diferentes especies

microbianas (Bilen *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha necesitado del uso de nuevas tecnologías para la comprensión de diferentes factores en el comportamiento de comunidades microbianas, ya que no todos sus miembros pueden ser cultivados con las técnicas actualmente conocidas. El uso de herramientas moleculares independientes de cultivo, en combinación con la aplicación de la teoría ecológica, ha resultado clave para avanzar en la comprensión de la estructura y función de sistemas microbianos complejos (Verstraete *et al.*, 2012). La metagenómica puede estar dada por dos tipos de estrategias de secuenciación: secuenciación de amplicones o secuenciación masiva al azar (*shotgun*). La primera de ellas utiliza un gen marcador, típicamente el que codifica para la subunidad 16S del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal. Este gen ha transformado la ecología microbiana gracias a la posibilidad de caracterizar extensivamente la estructura de las comunidades microbianas en ecosistemas de alta diversidad. Esto se ha realizado mayormente a través de la secuenciación de amplicones de una o más de las 9 regiones hipervariables (V1-V9) de este gen (Huse *et al.*, 2008).

La secuenciación por *shotgun* permite el estudio del rol funcional de los taxones presentes en la comunidad, además de sus características genómicas. De esta manera se pueden establecer relaciones funcionales entre los diferentes miembros microbianos y comprender tanto su presencia como las interacciones metabólicas que ocurren.

Genes marcadores y metagenómica

La metagenómica se encarga de estudiar el conjunto de genomas de una comunidad a partir de una extracción de ADN total, sin la necesidad del cultivo. Los primeros estudios metagenómicos se basaban en secuenciación de Sanger. El

primer paso era la segmentación del ADN metagenómico en múltiples fragmentos al azar. Luego, estos fragmentos eran clonados en plásmidos de gran tamaño como fósmidos, cósmidos y cromosomas artificiales (BACs) que crecen en bibliotecas monoclonales para obtener suficiente material genético para secuenciar. A partir de aquí, el ADN era secuenciado (secuenciación mediante fluoróforos acoplados a los cebadores) (Slatko *et al.*, 2011).

Desde su llegada, las tecnologías de segunda generación (NGS, del inglés Next Generation Sequencing) rápidamente ganaron terreno sobre la secuenciación Sanger. Este tipo de secuenciación permite obtener millones de lecturas en una sola corrida sin necesidad de clonar los fragmentos a secuenciar, permitiendo así optimizar el trabajo en tiempo y costo (Hall, 2007). Una de las mayores limitaciones de esta técnica es el tamaño de los fragmentos, que son más cortos comparados con la tecnología de secuenciación anterior.

Sin embargo, su alta profundidad de secuenciación representa una clara ventaja. Al mismo tiempo plantea un desafío técnico, ya que el procesamiento y análisis de millones de lecturas no es trivial. Es por esta razón que existe la imperiosa necesidad de un desarrollo bioinformático constante (Gerlach y Stoye, 2011; Huson *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2008). Particularmente en muestras ambientales, la secuenciación masiva al azar genera millones de lecturas de cientos de especies diferentes, lo que representa un desafío aún mayor.

El uso de genes marcadores para el estudio de la estructura de diferentes comunidades ha sido un gran avance en el estudio de poblaciones de microorganismos. El gen ribosomal 16S ha sido uno de los más utilizados para el estudio de comparaciones taxonómicas en procariotas, ya que este gen tiene una función esencial en la síntesis de proteínas, y está presente en todos los miembros

procarióticos. Estas secuencias de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) son diferentes entre las especies, pero se conservan dentro de una misma especie. Estas características permiten establecer una clasificación taxonómica precisa.

El método clásico para el estudio de comunidades microbianas a partir de genes marcadores es utilizar una porción variante del mismo y amplificarlo por la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR). De esta manera se obtienen numerosas copias del mismo gen facilitando así su posterior secuenciación.

En la última década, la secuenciación de todo el metagenoma en lecturas cortas permitió analizar en más detalle las diferentes comunidades microbianas. En estudios recientes, además, se utiliza la información de lecturas de todo el metagenoma para reconstruir genes marcadores, tales como el 16S ARNr y estudiar de esta manera la composición y diversidad de la comunidad. La secuenciación masiva al azar (*shotgun*) no tiene tanta profundidad como en el caso de la amplificación de genes marcadores; sin embargo se ha demostrado que es representativo de la comunidad (Durazzi *et al.*, 2021; Peterson *et al.*, 2021). Por otro lado, el uso de *shotgun* no tiene errores de PCR que pueden resultar en sesgos en análisis de comunidades en la utilización de esta técnica para estudiar la composición de las especies (Tremblay *et al.*, 2015).

Ensamblado de genes

La anotación directa de las lecturas mediante plataformas como MG-RAST (del inglés Metagenome - Rapid Annotation using Subsystem Technology), permite obtener información taxonómica y funcional de relevancia ecológica. Con pocas pares de bases por lectura se asocian a un subsistema, o a una familia de proteínas con la posibilidad de describir las abundancias y ubicarlas en rutas metabólicas

(Meyer *et al.*, 2008). Este tipo de anotaciones a partir de las lecturas individuales es útil para poder explicar funciones presentes en el metagenoma, permitiendo explicar el ambiente en el que habitan. Estudios de diversas comunidades bacterianas bajo esta metodología han permitido explicar el comportamiento de sistemas que anteriormente no era posible analizar por medio del cultivo de bacterias (Fierer *et al.*, 2012; Dinsdale *et al.*, 2008). Sin embargo, estos estudios no están libres de limitaciones, ya que las bases de datos actuales continúan siendo incompletas, lo que obliga a validar las asignaciones taxonómicas realizadas por otra vía (Gonzalez *et al.*, 2016; Randle-Boggis *et al.*, 2016). Frente a esta coyuntura, el ensamblado de lecturas metagenómicas provenientes de comunidades microbianas tiene como principal ventaja el hecho de alcanzar una clasificación taxonómica y funcional más robusta. La investigación en esta dirección tiene el potencial de facilitar la transición entre un enfoque puramente descriptivo a un modelo predictivo.

El ensamblado de lecturas metagenómicas consiste en el agrupamiento de las secuencias en *contigs* (secuencia consenso de fragmentos de ADN superpuestos) y de estos en *scaffolds* (que contienen la información de la orientación y orden de los *contigs*, como así también el largo del espacio entre cada uno de ellos). La calidad del ensamblado se obtiene por estadísticas que se realizan a sus *contigs* y *scaffolds*, siendo típicamente el tamaño total (pb), largo máximo, número de *contigs*, N50, etc. Pueden emplearse dos técnicas diferentes para el ensamblado de muestras metagenómicas: ensamblado *de novo* y ensamblado basado en genomas de referencia (co-ensamblado). El primero construye *contigs* a partir de las lecturas sin ninguna información acerca del genoma a ensamblar, en cambio, el co-ensamblado construye los *contigs* utilizando de guía secuencias de genomas previamente ensambladas (Thomas *et al.*, 2012). Los ensamblados *de novo* son

computacionalmente más complicados y requieren herramientas bioinformáticas que optimicen el tiempo computacional. La utilización de algoritmos basados en k-meros permiten mejorar la eficiencia. Un k-mero es una secuencia de largo k, donde k puede ser cualquier número entero menor al largo de la lectura. Esto permite buscar superposiciones en un tiempo considerablemente menor, reduciendo el costo computacional. Existen tres categorías de acuerdo a los algoritmos utilizados: grafos de Bruijn (DBG), Overlap Layout-Consensus (OLC) y grafos *greedy*. El algoritmo *greedy* busca la mejor superposición entre dos lecturas (*reads*) cualesquiera, asigna un puntaje de acuerdo a la similitud del alineamiento e iterativamente agrega nuevas *reads* que tengan un mejor puntaje que el anterior. OLC utiliza un grafo de superposiciones dividido en tres etapas, la primera de ellas es igual al algoritmo *greedy*, luego se generan grafos de superposición con la disposición aproximada de las secuencias ensambladas. Finalmente, con la información del grafo se realizan alineamientos múltiples para precisar la disposición y determinar la secuencia consenso. El algoritmo *de Bruijn* consiste en armar grafos que representan las superposiciones presentes en todas las secuencias. Este método tiene la ventaja de que no es necesario realizar las comparaciones entre todas las lecturas. Luego del armado del grafo se aplican modificaciones y simplificaciones, seleccionando los mejores caminos hasta obtener un grafo irreducible del que se obtienen los *contigs*. Este es uno de los más utilizados para el ensamblado de secuencias metagenómicas y es el empleado por los programas que se utilizan en este trabajo.

Ensamblado de genomas en metagenomas

Los *contigs* o *scaffolds* obtenidos luego del ensamblado de las lecturas metagenómicas pueden agruparse según su frecuencia de tetranucleótidos,

porcentaje de Guanina-Citosina (% GC) o su clasificación taxonómica, con el objetivo de agrupar secuencias pertenecientes a un genoma o un grupo de genomas (*binning*) (Miller *et al.*, 2010). La cobertura (*coverage*) de una secuencia está representada por el número de veces que se ha secuenciado esa base. Utilizar la información de la cobertura de los scaffolds como método de agrupamiento es posible si se utilizan datos de cobertura diferencial a partir de técnicas de extracciones de ADN diferentes (Albertsen *et al.*, 2013). Alternativamente es posible emplear este mismo método con muestras de una misma comunidad extraídas en tiempos diferentes.

La recuperación de genomas completos (o *drafts* de alta calidad) de bacterias y arqueas permite analizar el potencial “específico de taxón” de organismos dentro de su contexto funcional, revelando la versatilidad metabólica de los microorganismos, los mecanismos de adaptación ecológica y las interacciones tróficas.

Análisis de balance de flujos

El análisis de balance de flujos (ABF) es una aproximación matemática utilizada para estudiar el flujo de metabolitos a través de una red metabólica. La información genómica de los genomas reconstruidos a partir de metagenomas y la información experimental de dichos organismos pueden ser utilizadas para reconstruir modelos metabólicos a escala genómica (GSMM por sus siglas en inglés) (Thiele y Palsson, 2010). Los GSMM se elaboran mediante un conjunto de reacciones estequiométricas balanceadas que describen las asociaciones de reacción entre genes y proteínas para todo el repertorio metabólico de un organismo (O’Brien *et al.*, 2015). Estos modelos pueden ser utilizados en combinación con las simulaciones de flujos para generar datos fluxómicos.

Para el estudio de ABF, las reconstrucciones metabólicas a escala de genoma son convertidas en matrices estequiométricas (S), que incluyen la información de cada uno de los metabolitos consumidos y producidos en cada una de las reacciones presentes (Orth *et al.*, 2010). Para restringir el modelo, se define un vector de flujos (v), el cual es multiplicado por S, asegurando que la cantidad total de cualquier compuesto que se produzca debe ser igual a la cantidad total que se consume. El siguiente paso en ABF es la definición de un objetivo biológico, buscando su optimización o minimización. El más utilizado es la optimización de la reacción de biomasa, que representa a todos los metabolitos consumidos para la generación de una nueva célula. Otra posibilidad es utilizar como función objetivo la producción de un metabolito de interés. En este tipo de estudio no se consideran los parámetros cinéticos y se asume que las células se encuentran en un estado estacionario donde no hay acumulación neta de metabolitos (Diener *et al.*, 2020). Existen diferentes estrategias computacionales para implementar el análisis de balance de flujos. Uno de las más utilizados en el modelado de comunidades es el análisis y reconstrucción basado en restricciones (COBRA), bajo diferentes lenguajes de programación (de los cuales los más utilizados son Python y MATLAB) (Ebrahim *et al.*, 2013; Heirendt *et al.*, 2019). Los datos metabolómicos, meta-transcriptómicos, o la información del medio, entre otros, pueden integrarse a la matriz de restricciones, dando soluciones más realistas (Zampieri *et al.*, 2019).

El estudio de balance de flujos en estudios de digestión anaeróbica ya ha sido utilizado para describir las interacciones sintróficas, como por ejemplo entre *Desulfovibrio vulgaris* y *Methanococcus maripaludis* (Stolyar *et al.*, 2007), *Clostridium butyricum* y *Methanosarcina mazei* (Bizukojc *et al.*, 2010). Además, se analizó una red de interacciones entre 5 miembros de una comunidad (compuesta

por bacterias sintróficas y arqueas) (Embree *et al.*, 2015). Sin embargo, el análisis poblacional en digestores anaeróbicos alimentados por lodos mixtos y residuos de alimentos es una de las novedades en este trabajo, ya que hasta el momento no han sido analizados por esta técnica.

Perspectivas de esta tesis

Mundialmente se producen más de 2 mil millones de toneladas de residuos. Esto ha impulsado a muchas naciones a tomar decisiones que mitiguen la contribución al cambio climático causado por la emisión de diferentes gases en los residuos que no son tratados correctamente. Una opción para el tratamiento de los residuos orgánicos es degradarlos anaeróbicamente junto con los lodos de plantas de tratamiento. Por su alto contenido en materia orgánica biodegradable, el residuo orgánico es un sustrato útil para la producción de biogás mediante digestión anaeróbica. No obstante, la co-digestión de los residuos de alimentos con lodos activados podría ser más desafiante que la monodigestión de este segundo sustrato en lo que respecta a la gestión operativa del proceso anaeróbico. Un alto contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable puede conducir a la rápida acumulación de ácidos grasos volátiles, provocando la acidificación del digestor y, por tanto, la interrupción de la acción de diversos grupos de microorganismos implicados en la producción de biogás.

La economía circular se basa en utilizar los residuos y no descartarlos, de esta manera se disminuye la necesidad de explotación de recursos nuevos y la generación de contaminantes al medio ambiente. Por este motivo, la utilización de residuos orgánicos y lodos activados a fin de obtener biogás y un sustrato que puede ser usado como fertilizante es una aplicación de este tipo de concepto. La

generación de nuevos conocimientos de la co-digestión anaeróbica es fundamental para optimizar estos procesos y valorizar los residuos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la tesis es dilucidar los flujos de carbono y energía en digestores anaeróbicos que tratan barros excedentes de plantas de tratamiento de efluentes en co-digestión con residuos de alimentos. En particular, se ha puesto el foco en el análisis de genomas reconstruidos a partir de muestras metagenómicas, sus interacciones y sus capacidades metabólicas.

Hipótesis de trabajo

Las alteraciones que sufre la comunidad microbiana a causa del cambio en la composición del sustrato se debe principalmente a procesos determinísticos relacionados con las capacidades funcionales de los componentes microbianos.

Objetivos específicos

El primer objetivo específico de este trabajo consistió en desarrollar un modelo de biorreactores a escala de laboratorio para la co-digestión anaeróbica de mezclas de sustratos de barros de plantas depuradoras con residuo de alimento.

En el segundo objetivo del trabajo se propuso realizar el análisis metagenómico de una serie temporal correspondiente a la aclimatación de las comunidades microbianas de digestores de barro cloacal frente a cantidades crecientes de residuos de alimento. Se analizaron los cambios en la estructura y potencial

funcional de las comunidades microbianas de los reactores en función de la proporción de residuo de alimento en la mezcla, buscando establecer relaciones entre la diversidad de sustratos utilizados para alimentación de los reactores, la diversidad de las comunidades microbianas y la estabilidad funcional de los procesos.

Como tercer objetivo se propuso la reconstrucción de poblaciones de genomas de alta calidad para evaluar la interrelación de los procesos metabólicos que convierten la materia orgánica en metano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo y sustratos

El inóculo utilizado para la puesta en marcha de los reactores anaeróbicos en el laboratorio fue recolectado del digestor anaeróbico de la planta de tratamiento municipal Norte II de la empresa AySA, ubicada en la localidad de San Fernando, en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. El digestor es operado a una temperatura mesofílica y con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 21 días. Se realizaron estudios previos en *batch* para medir las diferentes propiedades del sustrato. De acuerdo a datos provistos por la PTLC, los sólidos totales y volátiles del inóculo eran de 2.920 y 1.920 mg L⁻¹ respectivamente. La alcalinidad total era de 2,71 g CaCO₃ L⁻¹, los ácidos grasos volátiles eran de 337,50 mg L⁻¹ y el pH de 7,12.

Se recolectaron semanalmente mezclas de lodo primario sedimentado y residuos de lodo activado, los cuales son utilizados para alimentar al digestor a gran escala. La proporción de lodo primario y lodo activado fue de aproximadamente 4:1, conjuntamente llamados lodos mixtos, que se utilizaron como sustrato diario para los 4 reactores de laboratorio. Los lodos mixtos (LM) se almacenaron en bidones de 5 L y se desinfectaron a 70 °C durante 90 minutos. Los sólidos totales y los sólidos volátiles de los LM fueron 4.650 y 3.250 mg L⁻¹, respectivamente. El nitrógeno Kjeldahl total fue de 2.153 mg L⁻¹ (699 mg L⁻¹ de nitrógeno amoniacal y 1.454 mg L⁻¹ de nitrógeno orgánico). Para el co-sustrato, se prepararon mezclas sintéticas que imitan la composición típica de los residuos de alimentos de restaurantes determinada a partir de un estudio realizado en el año 2016 por la empresa Benito Roggio Ambiental en el que se relevaron los residuos de restaurantes en las Comunas 2 y 14 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Melisa Altina y Rodrigo

Pontiggia, comunicación personal). Se utilizaron productos alimenticios de origen vegetal (68,4 %), animal (17,3 %) más el 14,3 % de las sobras de panadería, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición aproximada del residuo alimenticio utilizado como sustrato en los experimentos de co-digestión.

Residuo	Cantidad (g)
Manzana	416
Banana	488
Pan	319
Repollo	200
Pollo	208
Berenjena	204
Carne picada	152
Cebolla	108
Total	2094

Las mezclas de alimentos se prepararon semanalmente y se suspendieron en 1 litro de agua con pH ajustado a 7. Para evitar la degradación durante el almacenamiento, inmediatamente luego de preparada, la mezcla fue estabilizada térmicamente a 70 °C durante 30 minutos. La mezcla sintética final contenía 17 % de sólidos totales (90 % volátiles). Los contenidos de proteínas, grasas e hidratos de carbono fueron 3,2 %, 0,6 % y 12,6 % del peso seco. El nitrógeno Kjeldahl total en el residuo de alimentos fue en promedio de 5,1 g kg⁻¹.

Diseño experimental

Cuatro digestores anaeróbicos a escala de laboratorio con un volumen de trabajo de 5 litros (con una capacidad máxima de 10 litros) se alimentaron durante 161 días en reactores semicontinuos con agitación a 35 °C y un tiempo de retención de 21 días. El inóculo utilizado para los cuatro digestores anaeróbicos a escala de laboratorio se obtuvo del digestor anaeróbico de la planta de tratamiento de líquidos cloacales municipal descrito anteriormente. Los digestores se alimentaron diariamente y se agitaron intermitentemente con ciclos de 30 minutos encendidos y 60 minutos apagados. La alimentación se inició gradualmente con los lodos mixtos hasta que la tasa de carga de sólidos volátiles fue de 1,5 g SV L⁻¹ d⁻¹ en todos los digestores. Posteriormente, los digestores 2, 3 y 4 se aclimataron con adiciones graduales de residuos alimenticios (RA) hasta que las tasas de carga orgánica (TCO) fueron 2,5; 3,5 y 4,5 g SV L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. En el día 125, todos los digestores (incluido el digestor control 1) recibieron un pulso adicional de 2 g SV L⁻¹ d⁻¹ de RA durante dos semanas, seguido de un retorno a las condiciones de alimentación anteriores.

Análisis químicos

Sobre muestras de lodos tomadas diariamente de cada digestor se determinaron los sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) totales y los ácidos grasos volátiles (AGV) totales utilizando métodos estandarizados (secciones 2540B, 2540E y 5560C, respectivamente APHA AWWA, 1998). El volumen de biogás se midió con un medidor de gas tipo tambor Ritter TG 0,5/5, y la composición del biogás se determinó usando un Landtec Systems Gas Analyzer Biogas 5000.

Muestreo, extracción de ADN y secuenciación

Para el análisis del microbioma se recolectaron 2 ml de lodo a intervalos aproximadamente regulares durante los 161 días de funcionamiento del digestor (días 8, 20, 30, 34, 69, 83, 114, 125, 128, 135, 140, 161) y se almacenaron a -70 °C hasta completar la fase experimental. El ADN metagenómico se extrajo utilizando el kit FastDNA Spin para suelo (MP Biomedicals, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En INDEAR (Rosario, Argentina) se realizó la secuenciación masiva (*shotgun*) de 49 muestras a través de la plataforma Illumina HiSeq 2500 con la técnica de lecturas pareadas.

Filtrado de calidad de las secuencias

Se generaron 86,31 Giga pares de bases (Gpb), las cuales se depositaron en la base de datos de NCBI bajo el proyecto PRJNA544497. Las secuencias se filtraron mediante el programa Trimmomatic v0.33 (Bolger et al., 2014). Se eliminaron las lecturas menores a 100 pb, lecturas con calidad menor a 25 (Q25) y se cortaron las bases ambiguas (N). Después del filtrado de calidad, se conservaron 248.236.634 lecturas, lo que representa un total de 50,69 Gpb.

Ensamblado de secuencias ribosomales 16S

En virtud de analizar la estructura de la comunidad microbiana, se identificaron las secuencias metagenómicas correspondientes a genes ribosomales ARN a partir de lecturas filtradas utilizando Metaxa2 (Bengtsson-Palme et al., 2015). En un primer paso, el software examina las secuencias ribosomales de subunidad pequeña (del inglés SSU) de arqueas, bacterias y eucariotas mediante modelos ocultos de Markov (HMM). El algoritmo es capaz de reconocer secuencias de hasta 100 pb y

asignar a un posible gen completo en la base de datos. El segundo paso de Metaxa2 logra alinear las secuencias SSU extraídas basado en el algoritmo BLAST con una base de datos curadas a partir de la base de datos del gen 16S ARNr GreenGenes. Sin embargo este paso no fue utilizado ya que se optó por usar una base de datos más actualizada. Se ensamblaron las lecturas de los genes ribosomales de subunidades pequeñas (16S ARNr) de longitud casi completa (tamaño promedio: 1.296 nt) a partir de las lecturas extraídas por Metaxa2 y se agruparon con una identidad del 97 %, utilizando el programa EMIRGE (Miller et al., 2011). Las unidades taxonómicas operacionales (del inglés OTUs) se clasificaron utilizando la base de datos Silva v.132 (Pruesse et al., 2007) utilizando 97 % de identidad para asignar a las secuencias de la misma especie, 94,5 % para género y 88 % para familia. Las lecturas pareadas filtradas se mapearon a las secuencias 16S ARNr reconstruidas utilizando Bowtie2 para la estimación de la abundancia relativa de cada OTU en las comunidades. El procedimiento de este software consiste en alinear las pequeñas lecturas (250 pares de bases) en las secuencias de interés (en este caso secuencias entre 800 pb y 1500 pb) con los parámetros deseados. En este caso se optó por buscar las lecturas contenidas en las secuencias ribosomales sin discordancias (0 *mismatch*).

Ensamblado de los metagenomas y cálculo de la cobertura

Por otro lado, los datos de las lecturas filtradas de los 49 metagenomas fueron ensamblados *de novo* mediante el ensamblador MEGAHIT v1.1.2 (Li et al., 2015). Este programa utiliza grafos *de Bruijn* con el fin de optimizar el ensamblado. Sin embargo, a diferencia del clásico método de grafos *de Bruijn*, este software hace uso de la representación concisa de los grafos (SDBG del inglés succinct *de Bruijn*

graph). Este método permite acelerar la construcción de los *contigs* y bajar la demanda de la memoria RAM del servidor. Además, permite la utilización de una lista de k-meros, es decir una lista de la longitud de los fragmentos de las secuencias que son utilizadas para el armado del grafo. Se fijaron manualmente los k-meros entre 51 y 99 en pasos de 8 (lista de k-meros: 51,59,67,75,83,91,99). Se conservaron los *scaffolds* con una longitud mínima de 1000 bases (1 kpb) generando 142.031 *scaffolds*.

Para obtener la cobertura de cada *scaffold*, las lecturas se alinearon usando Bowtie2 v2.3.4 usando los parámetros predeterminados (el mismo procedimiento que para las secuencias ribosomales 16S). Se manipularon los archivos obtenidos mediante la herramienta Samtools (v1.5). Luego, por medio del script desarrollado por el laboratorio Berkeley Lab (*jgi_summarize_bam_contig_depths*) se calculó la cobertura de cada uno de los *contigs*. Dicho *script* tiene en cuenta la longitud de cada una de las lecturas, como así también la longitud de la secuencia. Además, considera que los extremos de los *contigs* tiene generalmente un menor número de lecturas asignadas con respecto al resto de la secuencia debido a la dificultad de mapear dicha región.

Reconstrucción de genomas a partir de los metagenomas (MAGs)

La reconstrucción de genomas a partir del metagenomas (MAG) se llevó a cabo siguiendo la técnica de cobertura diferencial, utilizando la cobertura de los *scaffolds* de más de 1 kpb en las 49 muestras por medio del programa MetaBAT v0.32.5 (Kang et al., 2015) y la tabla de abundancia obtenida con el *script* MetaBAT mencionado anteriormente. El método por el cual se agrupan las secuencias (proceso conocido como *binning*) comienza con el cálculo de la frecuencia de

tetranucleótido para cada *contig* y la abundancia en cada muestra. Se crea una matriz de distancia pareada utilizando modelos probabilísticos entrenados y se crean los *bins* de forma iterativa. Para establecer los parámetros óptimos de acuerdo a los datos, se evaluaron diferentes resultados cambiando los parámetros de entrada del programa, y en cada corrida se verificó la completitud y contaminación de los *bins* obtenidos mediante checkM v 1.1.2 (Parks et al., 2015), visualizándolos en R v3.4.4. Finalmente, el parámetro elegido fue “sensitive” (--p1 90 --p2 90 --pB 20 --minProb 80 --minBinned 40 --minCorr 92). Los 256 *bins* resultantes se curaron manualmente para reducir la contaminación. Se construyeron redes de co-ocurrencia con la información de la cobertura de los *scaffolds* y se visualizaron en Gephi v0.92. Se utilizó la correlación de Pearson para determinar las redes con una correlación mayor a 0.9 ($p < 0.001$) y se descartaron aquellas secuencias dentro de un *bin* con una correlación menor. Luego, para refinar aún más el *bin*, se utilizó la información de las frecuencias de tetranucleótidos y el porcentaje de guanina-citosina (% GC). Se descartaron los *scaffolds* con una frecuencia de tetranucleótidos menor a 0.9 y una diferencia de % GC mayor al 5 %. Cuando fue necesario, los *bins* se volvieron a ensamblar utilizando sólo las lecturas mapeadas. Finalmente los *bins* que tuvieran una completitud mayor al 50 % y una contaminación menor a 5 % se utilizaron para los estudios de la estructura y función de la comunidad microbiana considerándolo como MAGs (por sus siglas en inglés Metagenome-Assembled Genome).

Asignación taxonómica

La anotación taxonómica de cada MAG se realizó utilizando GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020) con parámetros predeterminados. GTDB-Tk utiliza árboles filogenéticos de

bacterias y arqueas construidos a partir del alineamiento de múltiples secuencias a partir de genomas de la base de datos de NCBI Assembly. La taxonomía provista por GTDB se encuentra en su sitio web (gtdb.ecogenomic.org). El primer paso consiste en buscar los marcos de lectura abierto a partir de las secuencias FASTA de los *contigs*. Luego se identifica la presencia de genes marcadores de bacterias y arqueas por medio de modelos ocultos de Markov y se ubican en un árbol de referencia. La clasificación taxonómica final se basa en la combinación de la posición del MAG en el árbol de referencia y en base a su identidad media de nucleótidos (ANI).

Se reconstruyó un árbol filogenético utilizando PhyloPhlan v3.0.51 (Asnicar et al., 2020) con el fin de validar la clasificación taxonómica asignada por GTDB-Tk. Al igual que en GTDB-Tk, se buscan genes marcadores, se alinean múltiples genes (MSA) y se reconstruye la filogenia. Sin embargo, en este caso, la lista de genes marcadores es más amplia posibilitando la comparación entre diferentes familias de genomas.

Normalización de datos

La información de cobertura de los *contigs* en cada muestra se normalizó frente a la cobertura media de genes esenciales de copia única. Para ello, se buscaron y extrajeron genes esenciales mediante el programa HMM.essential.rb descrito por Kostas lab (Rodriguez-R y Konstantinidis, 2016) en modo metagenoma (parámetro --metagenome). Para evitar genes más largos que puedan estar fragmentados, sólo se seleccionaron genes esenciales menores de 200 aminoácidos.

Estudio de la comunidad microbiana a partir de secuencias ribosomales

Se analizó el comportamiento de la comunidad frente al agregado de residuo alimenticio mediante la técnica de ordenación. El análisis restringido de coordenadas principales (del inglés CAP) se realizó con el paquete “vegan” versión 2.0-10 (Departamento de Estadística, Universidad Estatal de Iowa, Ames, IA, EE. UU.) en R 3.0.2, utilizando el índice de disimilitud Bray-Curtis y parámetros por defecto. Este tipo de análisis explora las relaciones entre dos matrices, una matriz respuesta y otra explicativa. Es similar al análisis de redundancia (RDA), en el cual se realiza una regresión multivariada seguida de un ordenamiento de coordenadas principales (PCA) en los valores ajustados, pero utilizando otro tipo de distancia no euclidiana.

Estudio de la estructura microbiana por medio de redes de co-ocurrencia

Con el fin de estudiar los cambios en la estructura microbiana se construyeron redes de co-ocurrencia utilizando la abundancia de las OTUs y MAGs a lo largo de todo el experimento. Se calcularon correlaciones entre OTUs, entre MAGs y entre OTUs y MAGs. Las correlaciones de coeficientes de Pearson con valores superiores a $|0,7|$ y un valor $p < 0,01$ se consideraron para construir cada una de las redes. La visualización se realizó en Gephi v0.92.

Se calculó en cada caso la modularidad mediante el "método de Louvain" (Blondel et al., 2008) utilizando el algoritmo de agrupación implementado en Gephi. En el caso de la red de OTUs y OTUs-MAGs, los módulos se filtraron para eliminar los nodos con un grado inferior a 2.

Asignación funcional

El marco de lectura abierto (ORF) de cada *contig* y las secuencias de proteínas se predijeron utilizando Prodigal v2.6.3. La anotación funcional de cada gen predicho se anotó con el servidor de anotaciones automático Ghost KOALA que utiliza la base de datos KEGG (Kanehisa et al., 2016), y eggNOG v5.0, que establece relaciones de ortología entre genes mediante eggNOG-mapper v2.0.1 (Cantalapiedra et al., 2021), utilizando los parámetros predeterminados y el DIAMOND para alinear las secuencias. Las enzimas activas en carbohidratos se anotaron utilizando dbCAN y la base de datos CAZy (v4.0) (Lombard et al., 2014). Las enzimas que degradan proteínas se anotaron con la base de datos MEROPS (Rawlings et al., 2014) (Versión 12.3) alineando las secuencias con el software diamond y manteniendo solo las enzimas extracelulares y de membrana externa. Las lipasas se buscaron utilizando modelos ocultos de Markov de la base de datos de ingeniería de lipasa (LED, versión 4.1.0).

Análisis de balance de flujos (ABF)

Para el estudio de flujos de carbono entre los diferentes MAGs reconstruidos, primero se realizó un nuevo ensamblado para obtener un número mayor de MAGs con una completitud de al menos 90 %. Sobre estos nuevos MAGs se predijeron los caminos metabólicos y finalmente se predijeron los flujos de carbono entre estos genomas.

Reconstrucción de genomas de alta calidad

El análisis de balance de flujos, a diferencia del estudio funcional poblacional a partir de los genomas ensamblados a partir de metagenomas, requiere que los genomas

tengan una completitud de por lo menos 90 %. Por este motivo, se decidió volver a realizar ensamblados de los metagenomas y agrupamientos de *contigs* mediante diferentes enfoques e integrarlos con los resultados obtenidos anteriormente. Previamente se había optado por ensamblar todos los metagenomas juntos (49 muestras) utilizando el software MEGAHIT. En esta instancia se realizaron tres nuevos ensamblados utilizando metaSPADES (Nurk et al., 2017). Se utilizaron, al igual que el primer ensamblado, 49 muestras pero también se ensamblaron solamente las muestras con residuo alimenticio (36 muestras) y otro ensamblado enfocado a 6 muestras particulares del reactor 3 (días 50, 69, 114, 128 y 135). El ensamblador metaSPADES, al igual que el usado anteriormente, se basa en la construcción de grafos de *de Bruijn* para la generación de los *contigs* a partir de las lecturas cortas. Sin embargo requiere grandes cantidades de memoria RAM comparado con MEGAHIT, ya que se genera una lista más amplia de k-meros posibles para optimizar el ensamblado.

Para cada uno de los ensamblados (incluyendo el realizado con MEGAHIT) se agruparon los *contigs* (técnica llamada *binning*) por medio de diferentes programas. Anteriormente se había utilizado MetaBAT con el parámetro “sensitive”. En esta ocasión se optó por repetir este procedimiento y paralelamente se utilizaron otros 2 programas, maxBin y vamB (Nissen et al., 2021; Wu et al., 2014). Al igual que MetaBAT, estos programas utilizan la información de la frecuencia de tetranucleótidos y cobertura de los *contigs* o *scaffolds* para agruparlos en *bins* diferentes. Sin embargo, maxBin integra un parámetro de maximización de la expectativa, el cual itera sobre un número de veces dados (por defecto 50), calculando la probabilidad de cada *scaffold* pertenezca al *bin* que se lo asignó de acuerdo a la frecuencia de tetranucleótidos y cobertura y recalculando los mismos

valores de acuerdo a la probabilidad obtenida. Si el valor obtenido supera un umbral, el *scaffold* forma parte del *bin*, caso contrario se descarta. En el caso de VAMB, la información es utilizada para generar un conjunto de datos y mediante aprendizaje automático (*machine learning*) clasifica a los diferentes *scaffolds* en posibles *bins*.

Luego de cada uno de los ensamblados con la posterior agrupación en conjuntos de *scaffolds*, se desreplicaron todos los *bins*. Es decir, se utilizó la información de las secuencias para descartar aquellos MAGs repetidos. Para ello primero se verificó la completitud de cada MAG utilizando checkM, y solo se conservaron aquellos con una completitud mayor al 50 %. Utilizando el software dREP (Olm et al., 2017) se realizaron las comparaciones genoma-genoma para todo el conjunto de MAGs obtenidos. El análisis central de este programa para diferenciar si dos MAGs son iguales o no es el cálculo de identidad nucleotídica promedio (ANI por sus siglas en inglés). El ANI es una medida de similitud genómica a nivel de nucleótidos entre las regiones codificantes de dos genomas. Finalmente para obtener MAGs más completos, se realizó una segunda desreplicación con una base de datos obtenida en un estudio de digestores anaeróbicos a lo largo del mundo (Campanaro et al., 2020). Para el estudio de ABF solamente se conservaron los MAGs con una completitud mayor al 90 %.

Generación de modelos metabólicos

Las reconstrucciones manuales de modelos metabólicos a escala de genoma suelen ser laboriosas y no del todo correctas. Por esta razón se suelen utilizar métodos computacionales. En este trabajo se predijeron los modelos metabólicos de cada uno de los MAGs por medio del programa gapseq (Zimmermann et al., 2021).

Primero se predicen los caminos metabólicos y transportadores por medio de la secuencia del MAG y diferentes bases de datos. Se integran los resultados para reconstruir el modelo metabólico y se realiza un último análisis que consiste en evaluar si los caminos metabólicos incompletos en el modelo pueden considerarse completos en el MAG (*gapfilling*). Este procedimiento considera el camino más parsimonioso para generar biomasa de acuerdo al medio presente. En otras palabras, si un organismo es detectado en una muestra que tiene una composición de alimento conocida y los caminos metabólicos con los que el organismo podría crecer están incompletos en su genoma, el programa los completa.

Conociendo cada uno de los componentes del residuo de alimento, se estimaron los valores de sustratos para que puedan ser utilizados por gapseq para el paso de *gapfilling*. Para tal fin se utilizaron dos base de datos diferentes, una proporcionada por estudios de digestores anaeróbicos en el laboratorio de Campanaro (comunicación personal, datos no publicados) y otra a partir de estudios de microbioma intestinal (<https://www.vmh.life/>). Los sustratos de lodos mixtos se calcularon a partir de estudios realizados en diferentes digestores municipales y de laboratorio que fueron alimentados con lodos proveniente de plantas de tratamiento municipal (Campanaro et al., 2018; Ruiz-Sánchez et al., 2018).

Modelado a escala de metagenoma

Todos los modelos metabólicos obtenidos por gapseq fueron analizados por MICOM (Diener et al., 2020). Con la información del modelo metabólico a escala de genoma, MICOM logra establecer interacciones entre los diferentes organismos. Calcula los flujos de importe y exportación de cada uno y verifica si los productos de un MAG pueden ser utilizados como sustratos de otro por medio de la función

cooperative_tradeoff. Este software logra calcular además el crecimiento de cada organismo utilizando los flujos de los metabolitos que son incorporados por el MAG. Para contrastar esta medida con una técnica independiente de flujos metabólicos, se calculó el crecimiento bacteriano por medio de la cobertura utilizando CoPTR (Joseph et al., 2021). Este programa se basa en la cobertura del genoma para determinar la relación pico/valle (PTR del inglés peak-to-trough ratio) de las lecturas mapeadas a lo largo del MAG y ajusta a un modelo probabilístico para estimar el PTR y el origen de replicación.

Los modelos metabólicos fueron analizados a través del módulo COBRAPy (Ebrahim et al., 2013) utilizando python 3.7.

RESULTADOS

Funcionamiento de los reactores

Los cuatro digestores anaeróbicos a escala de laboratorio se inocularon con lodo de un digester anaeróbico de una planta de tratamiento de líquidos cloacales (PTLC) y se alimentaron inicialmente con lodos mixtos (LM), es decir, una mezcla de lodos primarios y lodos secundarios recolectados de la misma PTLC. Posteriormente, cada digester, excepto el digester control (Reactor 1), recibió residuos de alimentos (RA) además de los LM, aumentando la carga de sólidos volátiles a una tasa del 10 % por día (Figura 6).

Una vez que la alimentación de los digestores alcanzó la carga orgánica deseada, el régimen de alimentación se mantuvo durante 5 tiempos de retención hidráulica (TRH). Se inició una fase adicional del experimento el día 125, en el que todos los digestores (incluido el digester control) recibieron un aumento de RA durante dos semanas, seguido de un retorno a las condiciones de alimentación previas.

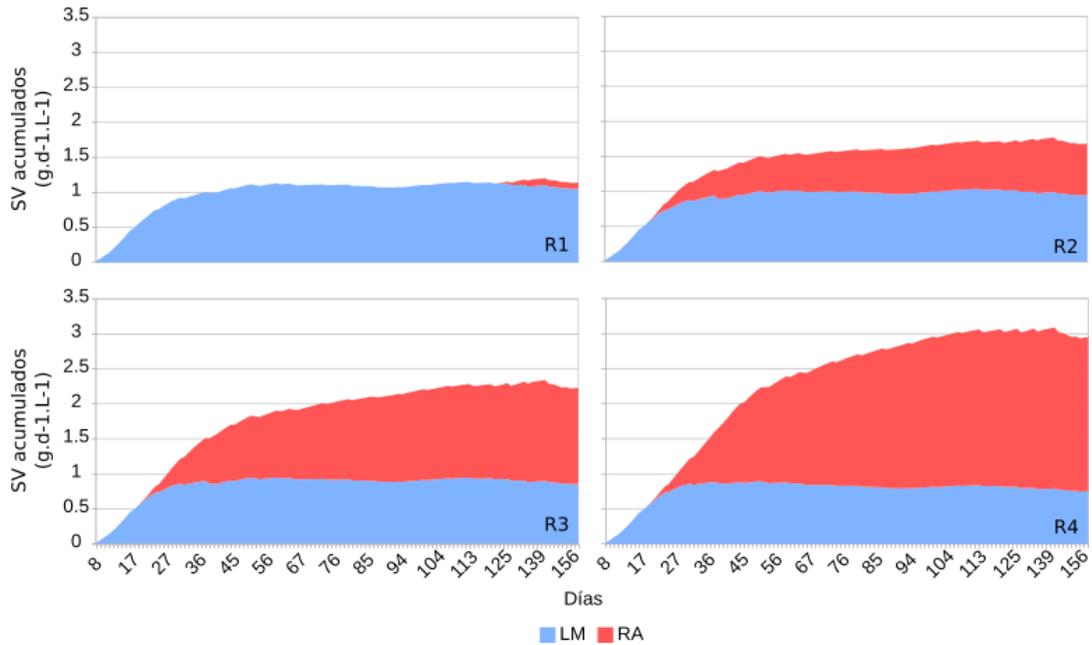


Figura 7: Acumulación de sólidos volátiles a lo largo del experimento en cada uno de los 4 reactores.

La alimentación de lodos mixtos (LM - celeste) se mantuvo constante a partir del día 20 hasta finalizar el experimento, mientras que los residuos alimenticios (RA - rojo) variaron entre los reactores y a lo largo del experimento.

La concentración de ácidos grasos volátiles permaneció baja en todos los digestores sin que se haya detectado su acumulación durante todo el estudio. La producción específica de biogás aumentó significativamente en los reactores con RA respecto del control. Sin embargo el rendimiento específico de metano fue disminuyendo a medida que se aumentó la proporción de residuos alimenticios (TABLA 2).

Tabla 2: Rendimiento del proceso. Producción específica de biogás (PEB), ácidos grasos volátiles, AGV. Alcalinidad total, ALC. Se calculó si las diferencias entre los valores de PEB eran significativas y se anotaron junto a la medición al grupo que pertenecían (valor $p < 0,001$).

	PEB (ml g SV ⁻¹)	Promedio de contenido de metano (%)	Promedio AGV (mg L ⁻¹)	Promedio relación AGV/ALC
Reactor 1	568 ^(A)	66,3 ± 2,9	151,2 ± 71,1	0,04 ± 0,02
Reactor 2	637 ^(B)	59,9 ± 3,1	152,6 ± 44,7	0,04 ± 0,01
Reactor 3	665 ^(C)	57,8 ± 1,9	208,2 ± 104,6	0,05 ± 0,03
Reactor 4	683 ^(C)	55,9 ± 1,5	226,9 ± 93,7	0,05 ± 0,02

Diversidad y dinámica de las poblaciones en función de las características del sustrato

La caracterización de la estructura de la comunidad microbiana en los diferentes digestores anaeróbicos se realizó inicialmente por medio del análisis de un gen marcador, el gen ribosomal 16S. Existen diversas herramientas bioinformáticas que permiten la reconstrucción *de novo* de genes ribosomales a partir de las secuencias metagenómicas (Gruber-Vodicka et al., 2020.; Miller et al., 2011; Pericard et al., 2018). En este trabajo se optó por trabajar en conjunto con Metaxa2 y EMIRGE para obtener las secuencias del gen 16S ARNr. En un primer paso se extrajeron todas las lecturas pertenecientes a secuencias ribosomales mediante Metaxa2 a partir de 49 metagenomas. Se obtuvieron un total de 295.487 lecturas pertenecientes a ARNr (promedio por muestra: 6.030). Luego se procedió a ensamblar las lecturas en *contigs* utilizando EMIRGE para finalmente reconstruir un total de 539 genes de ARNr de subunidades pequeñas de más de 800 pb. Uno de los criterios para la formación de las diferentes secuencias fue separarlas por el porcentaje de similitud, utilizando en este caso el 97 %. La mediana de los genes ribosomal 16S (llamadas

a partir de ahora OTU por las siglas en inglés de unidades taxonómica operacionales) fue 298 (máximo: 347, mínimo: 212) (Figura 8).

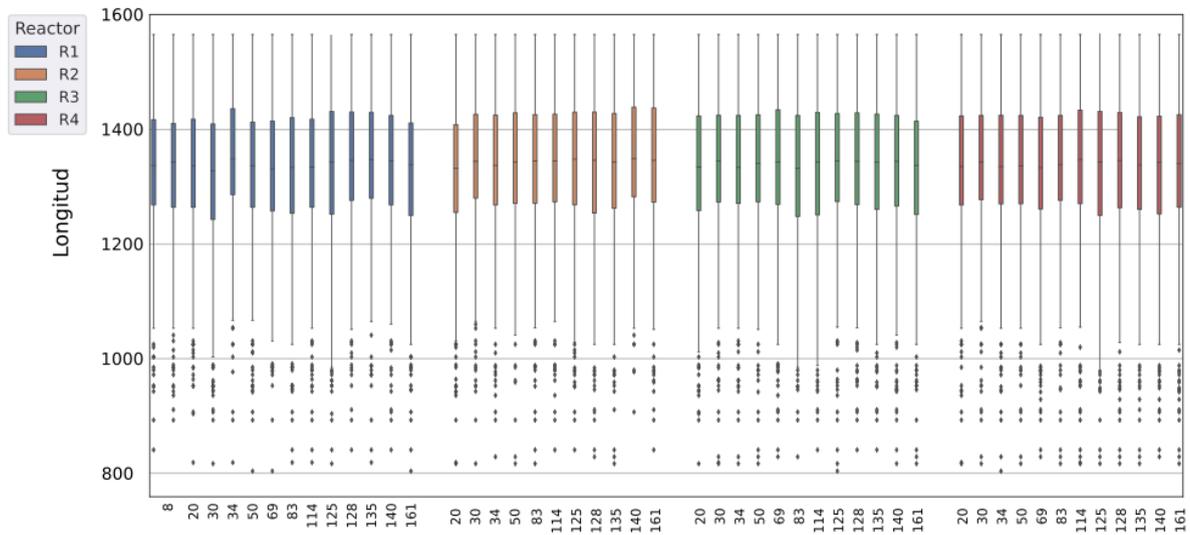


Figura 8: Distribución de las secuencias ribosomales 16S a lo largo de las muestras con la información de longitud.

Se realizaron curvas de rarefacción para poder determinar la diversidad alfa de la comunidad. La asintótica de las curvas indica que la profundidad de secuenciación cubrió adecuadamente a los miembros de la comunidad microbiana más abundantes (Figura 9).

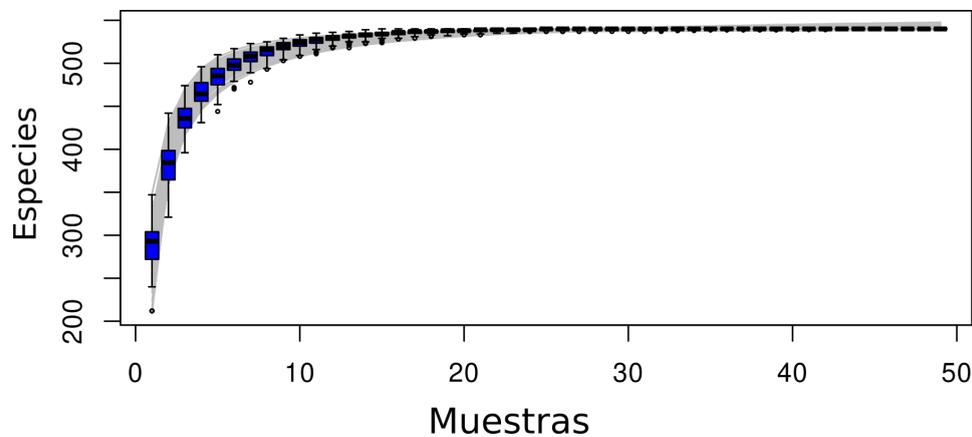


Figura 9: Curva de rarefacción de OTUs.

El índice Shannon fue calculado para cada una de las muestras, mostrando solamente diferencias significativas entre el reactor 1 y el 2 (Figura 10).

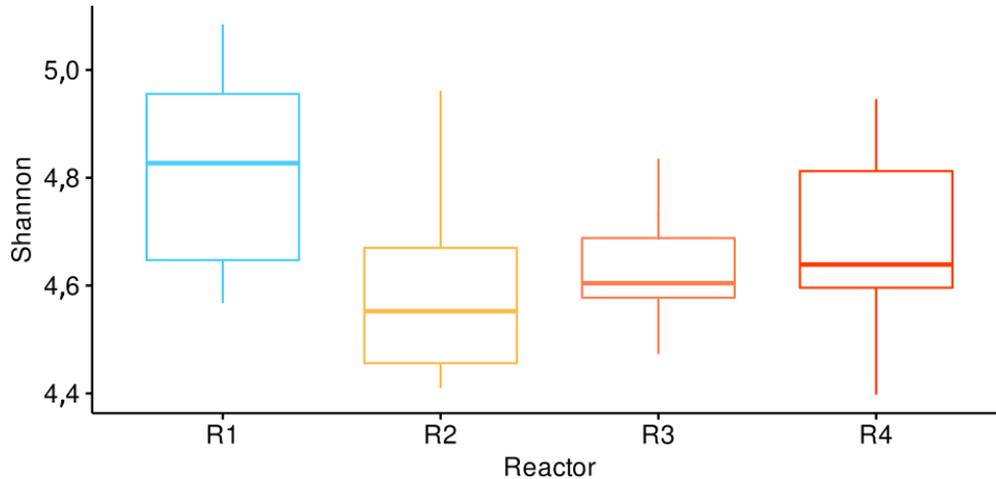


Figura 10: Boxplot de índice Shannon por cada muestra. La diversidad alfa fue calculada a partir de la información de las OTUs. Las diferencias de los valores obtenidos para cada reactor se compararon estadísticamente obteniéndose una diferencia significativa solamente entre el reactor 1 y 2 ($p < 0,001$) (T-test)

Se compararon además las muestras clasificadas en 2 grupos según si recibieron o no residuo alimenticio o solamente lodos mixtos (en cada caso el n fue de 20) (Figura 11). La diversidad alfa del grupo de muestras que no recibió RA presentó valores superiores, con un promedio de $4,85 \pm 0,17$, mientras que el conjunto de muestras pertenecientes a la co-digestión tuvo un índice Shannon de $4,51 \pm 0,15$. Se realizó una prueba *t de Student* verificando que las diferencias observadas eran significativas con un p-valor menor a 0,001 entre estos dos grupos.

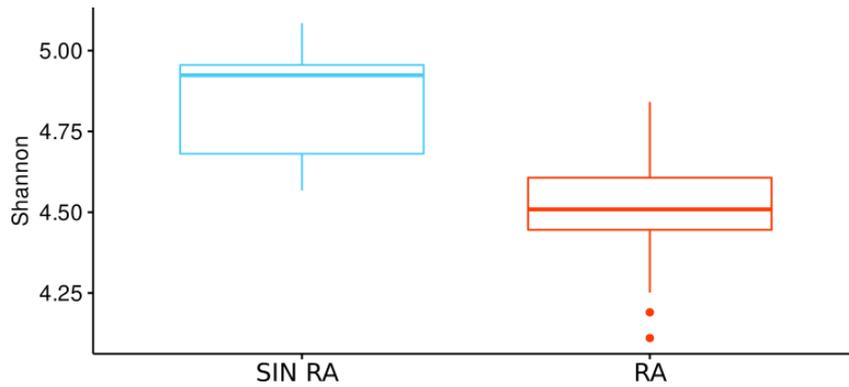


Figura 11: Boxplot de índice Shannon entre las muestras que no recibieron residuo alimenticio (SIN RA) y las que sí lo hicieron (RA). Entre ambos grupos hay una diferencia estadística (T-test) con un valor p menor a 0,001

Para explorar la respuesta de la comunidad microbiana a los cambios en la composición del sustrato se analizaron los perfiles de la abundancia de las OTUs mediante el análisis restringido de coordenadas principales (del inglés CAP) (Figura 12). Cada punto del ordenamiento CAP representa la estructura de la comunidad de una muestra en un solo punto temporal. Los colores de los símbolos varían a lo largo del gradiente de tasa de carga orgánica en el momento del muestreo. En cada uno de los 4 digestores, la mayor concentración de sólidos volátiles de los residuos de alimentos en el co-sustrato estuvo acompañada de un cambio en las comunidades microbianas. Este fue también el caso del pulso adicional de RA iniciado el día 125, que replicó la dirección de los cambios en todos los digestores, como se muestra en la Figura 12.

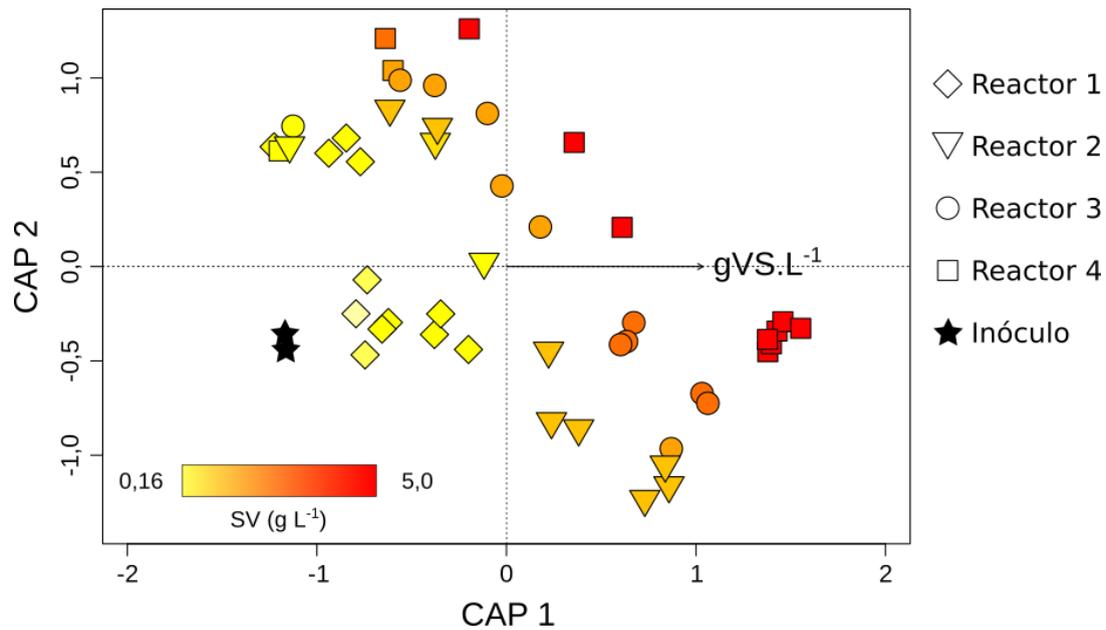


Figura 12: Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis de a pares. Los digestores se indican mediante símbolos: R1: rombos; R2: triángulos; R3: círculos; R4: cuadrados y los dos inóculos corresponden a las estrellas. La intensidad de los colores varía a lo largo de un gradiente de la tasa de carga orgánica en el momento del muestreo.

La estructura del microbioma en cada muestra en cada uno de los reactores permitió observar un desplazamiento de la comunidad debido al agregado de residuo alimenticio. Además, se pudo corroborar que los cambios producidos varían en todos los reactores al cambio de sustrato y no depende del reactor, sugiriendo que actuaron como réplicas a pesar de tener una proporción de RA diferente (Figura 12).

Redes de co-ocurrencias revelan una estructura modular debido al cambio en la composición del alimento

Se realizaron redes de co-ocurrencias con el propósito de estudiar las asociaciones entre microorganismos en relación a la composición y a la variación del sustrato de alimentación de los digestores. Se construyó una red global utilizando los datos de la abundancia de las OTUs de todos los digestores tomados durante el transcurso

del tiempo del experimento. El grafo estuvo representado por 231 nodos con una gran cantidad de correlaciones positivas (766) y solamente 23 correlaciones negativas (coeficiente de Pearson $r > |0,7|$, valor $p < 0,01$). Cada nodo de la red representa un taxón, con un tamaño proporcional a su abundancia relativa en la muestra (Figura 13 (A)). La distribución del grado de los nodos se ajustó al modelo “*Power law*” ($R^2 = 0,87$), es decir, la probabilidad $P(k)$ de que un nodo de la red interactúe con k otros nodos decae siguiendo una distribución de $P(k) \sim k^{-\gamma}$, con $\gamma = 1,15$. Esta propiedad es indicativa de una red “libre”, donde los nodos con grados pequeños son más frecuentes, pero también hay nodos altamente conectados (*hubs*) (Albert, 2005).

La red exhibió una estructura modular, con un índice de modularidad de 0,475. Un módulo en la red es una subred que tiene mayor cantidad de conexiones internas que externas, es decir, un grupo de OTUs altamente interconectadas que tiene menos conexiones con OTUs fuera del grupo. Estos módulos representan agrupaciones de taxones microbianos que potencialmente interactúan o comparten el mismo nicho ecológico sin interacción directa. Los dos módulos principales se destacan en la Figura 13 (B).

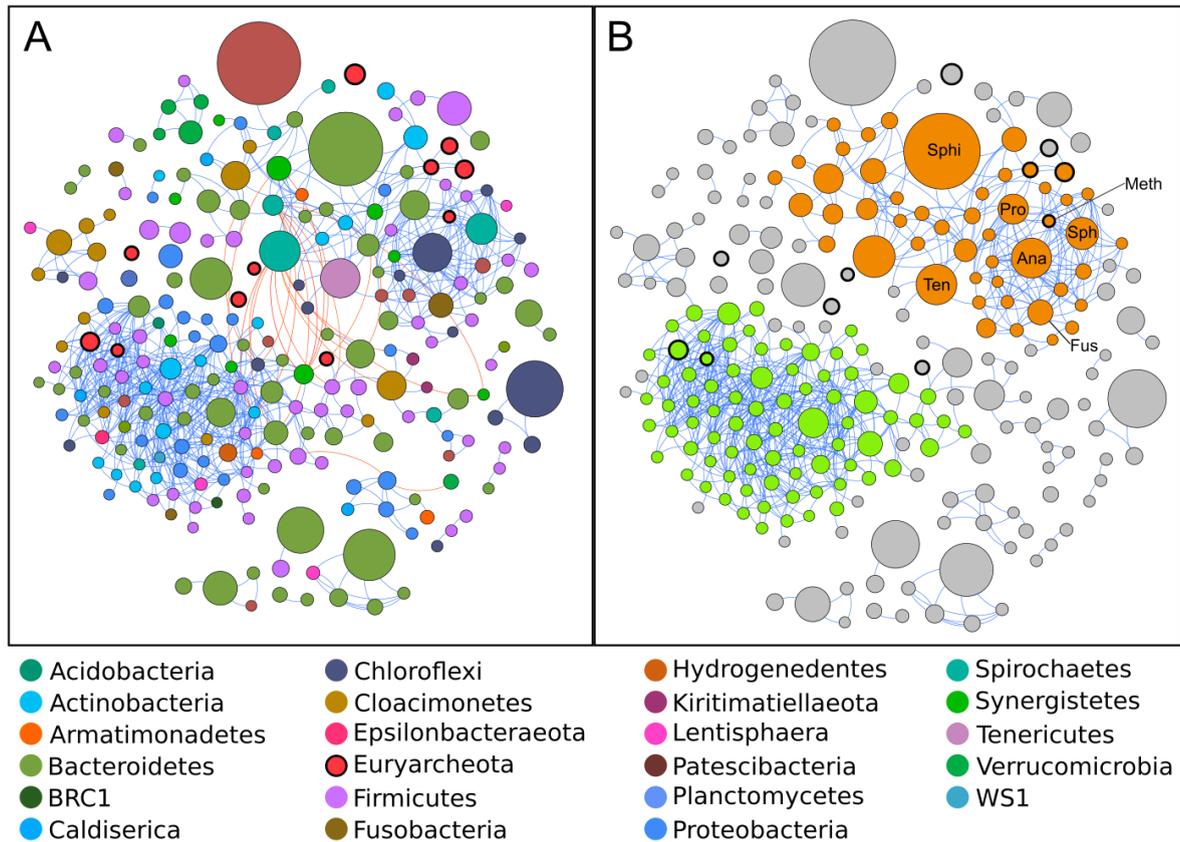


Figura 13: Red de co-ocurrencia construida usando 49 muestras metagenómicas de los cuatro digestores. Cada nodo representa un taxón, con un tamaño proporcional a su abundancia relativa en todas las muestras, mientras que las líneas azul y rojo entre los nodos representan correlaciones positivas y negativas entre taxones, respectivamente. Se consideraron significativas las correlaciones del coeficiente de Pearson con un valor inferior a - 0,7 y superior a 0,7, y valor $p < 0,01$. (a) Los nodos (OTU) están coloreados por filo. (b) Los nodos se colorean de acuerdo con su pertenencia a los dos módulos principales. Abreviaturas: Sphi: Sphingobacteriales, ST-12K33 Ana: *Anaerolinaceae*; Sph: *Sphaerochaeta*; Pro: *Proteiniphilum*; Ten: Tenericutes; Fus: Fusobacteria; Meth: Methanomassiliococcales.

Se estudiaron las subredes durante el período en el que la producción acumulada de biogás fue lineal, desde el inicio del experimento hasta el día 114 (Figura 14), es decir, antes de que los digestores fueran sometidos al incremento abrupto de carga orgánica. Separar cada subred en diferentes tiempos permitió visualizar claramente el cambio en la dinámica del microbioma que acompaña a los cambios en la alimentación de los digestores. Se observó que también hay cambios en el digestor

control, interpretado como un efecto de la inmigración producido por el cambio (semanal) en la composición de los lodos de la PTAR, o alternativamente en términos de la dinámica de aclimatación a las condiciones a escala de laboratorio, ya que el experimento se inició poco después de que el inóculo se transfiriera a los reactores de laboratorio. No obstante, estos cambios no interfieren con la interpretación del efecto principal causado por los cambios en el régimen de alimentación.

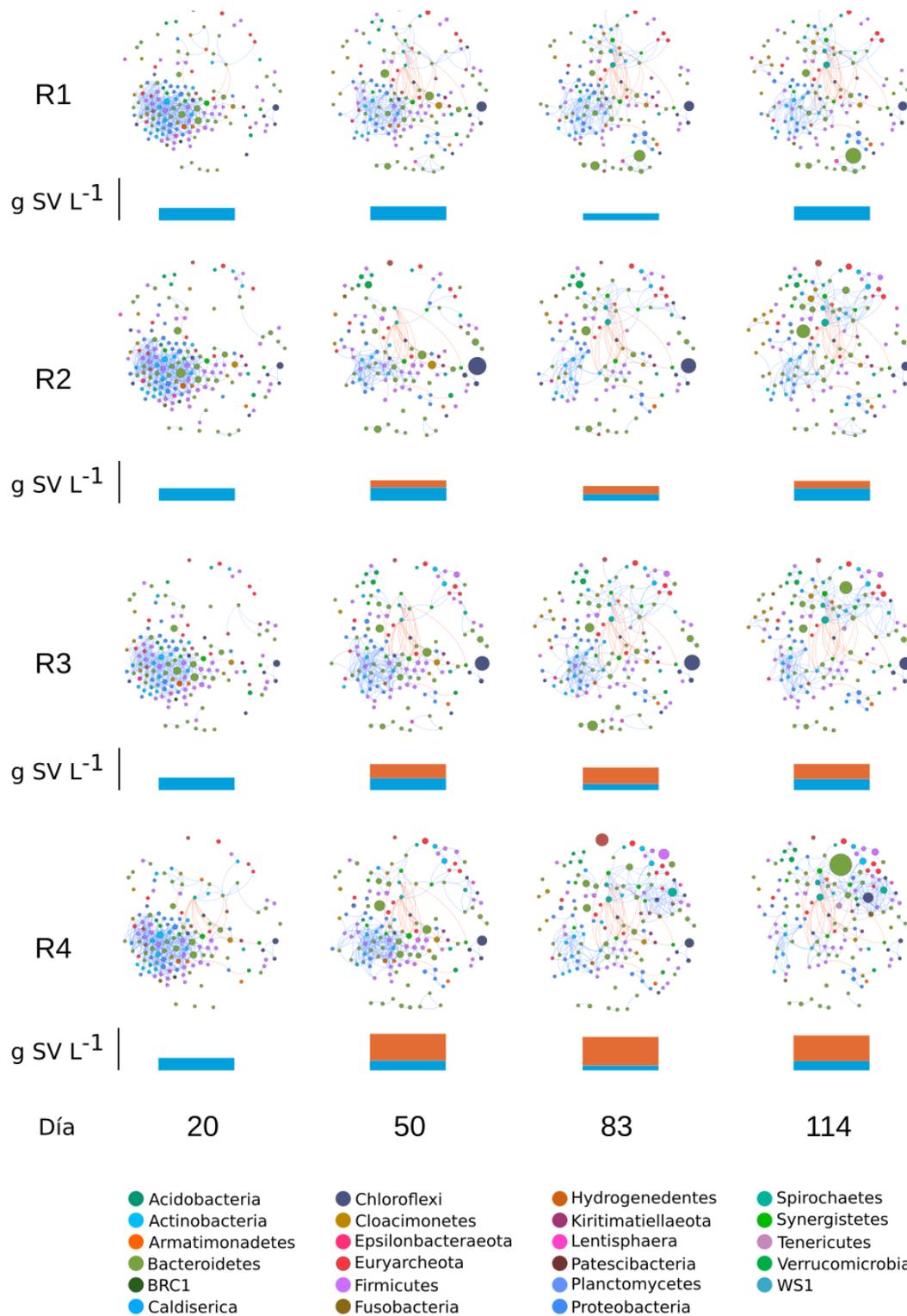


Figura 14: Dinámica de la red de conexiones de co-ocurrencias de OTUs. Los cuatro digestores se denominan R1 a R4. Las subredes se extrajeron de la red global. El tamaño de los nodos es proporcional a la abundancia relativa de las OTUs en cada muestra individual. Las columnas apiladas son sólidos volátiles de lodos mixtos (en azul) y residuos de alimentos (en naranja) que se alimentaron diariamente a los digestores en el momento del muestreo.

El primer módulo (grado medio = 11,34, parte inferior izquierda en la Figura 13-B) está presente durante el funcionamiento inicial de los reactores a escala de laboratorio y se asoció a grupos de microorganismos adaptados a las características específicas del hábitat del digestor a gran escala de donde se obtuvo el inóculo. En estas muestras la concentración de SV era baja. El segundo módulo de microorganismos coexistentes (grado medio = 8,08, arriba a la derecha en la Figura 13-B) acompañó el aumento del contenido de RA en el alimento. Se detectaron estos microorganismos en todos los reactores, aunque con una baja abundancia en el reactor control y un gran aumento en los digestores con RA (Figura 15).

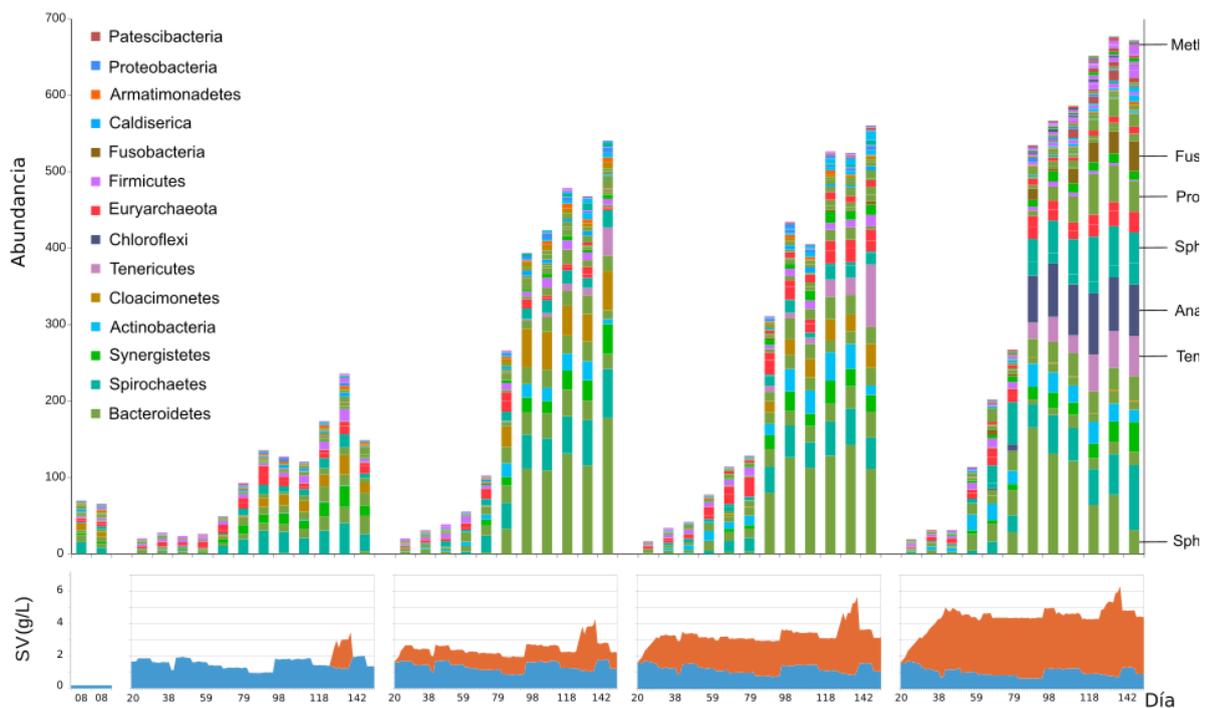


Figura 15: Distribución de la abundancia de las OTUs que pertenecen al módulo que responde positivamente al aumento de residuo de alimento a lo largo de los diferentes reactores y tiempo. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 13. El gráfico en la parte inferior corresponde a la tasa de carga de sólidos volátiles, de lodos activados (azul) y de residuo de alimentos (naranja).

En el módulo asociado a la adición de RA como co-sustrato se encontraron 49 taxones, incluyendo bacterias hidrolíticas y fermentativas pertenecientes a los filos Chloroflexota, Spirochaetota, Fusobacteriota, Patescibacteria y Firmicutes (Figura 15). El módulo también incluyó bacterias sintróficas pertenecientes al filo Synergistota y cuatro arqueas metanogénicas. Una característica distintiva de este módulo es el aumento de la dominancia de algunas especies, en contraste de la uniformidad en la abundancia de especies observada en condiciones de baja carga orgánica.

Un miembro destacado por su alto número de conexiones, presente del módulo abundante en el digestor con la mayor concentración de RA, es una bacteria de la familia *Anaerolineaceae* (filo Chloroflexota), conocida por su capacidad de fermentar carbohidratos en la digestión anaeróbica de residuos alimenticios (Narihiro *et al.*, 2009; Tonanzi *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2014; Zamanzadeh *et al.*, 2016). Otra bacteria abundante en altas concentraciones de RA es *Sphaerochaeta* (filo Spirochaetota). Se encontraron además bacterias abundantes en muestras con alto RA pertenecientes al filo Firmicutes de la clase *Bacilli* (orden Izemoplasmatales).

El metanógeno *Methanomassiliicoccales* correlacionó positivamente con los taxones antes mencionados dentro del módulo relacionado con alta carga de residuos de alimentos. El orden *Methanomassiliicoccales* se ha identificado en diversos entornos anaeróbicos, incluidos los tractos gastrointestinales de humanos (Borrel *et al.*, 2014), así como en muestras ambientales y gastrointestinales no humanas (Parks *et al.*, 2017). Este organismo es capaz de reducir compuestos metilados dependiente de hidrógeno a metano (Speth y Orphan, 2018). Las arqueas metanogénicas con menos conexiones en la red correspondieron a los géneros *Methanospirillum*, *Methanosaeta* y *Methanoculleus*, pertenecientes también al módulo de alto RA. Sin

embargo, otras arqueas metanogénicas del género *Methanosaeta* se encontraron abundantes, pero no exclusivas en las condiciones de alta carga orgánica, y por lo tanto no formaron parte de la red de co-ocurrencia. Estas arqueas fueron relativamente abundantes y también podrían estar involucradas en la producción de biogás durante todo el período estudiado.

Los resultados permitieron observar cómo el alimento influye en la estructuración de la comunidad microbiana. Con el propósito de indagar en las funciones que poseen estos organismos se reconstruyeron genomas a partir de los metagenomas.

Reconstrucción de genomas a partir de metagenomas

Se reconstruyeron 259 genomas a partir de los 49 metagenomas (MAG por su sigla en inglés). Se estimó la contaminación y completitud de cada uno de los MAGs por medio del software CheckM pudiendo clasificar a 196 de ellos con una completitud mayor a 50 % y una contaminación menor al 6 %. De ellos, 54 poseen una completitud mayor al 90 %, considerándose de alta calidad (Bowers *et al.*, 2017). Los MAGs se clasificaron en 33 filos diferentes, que incluyen miembros de todos los diferentes gremios involucrados en la digestión anaeróbica (Campanaro *et al.*, 2018; Fontana *et al.*, 2018). Los filos más abundantes fueron Bacteroidota (36 MAGs), Firmicutes_A (23 MAGs) y Actinobacteriota (15 MAGs). También se encontraron en alta proporción bacterias sintróficas, como Desulfobacterota, y arqueas metanogénicas, representadas por Halobacteriota (Figura. 16). Los diez MAGs más abundantes pertenecieron a Cloroflexota (MAG.118, f:*Anaerolineaceae*), seguido de cuatro MAGs dentro del filo Bacteroidota (MAG.71, MAG.141, MAG.69 y MAG.165, todos en el orden *Bacteroidales*), una Spirochaetota (MAG.148 g:*Rectinema*), el

Una de las principales dificultades en la reconstrucción de genomas a partir de metagenomas es la de lograr ensamblar secuencias del ARN ribosomal 16S, debido a que estas secuencias en organismos estrechamente relacionados suelen ensamblarse juntas. Además, los métodos de ensamblado basados en k-meros suelen confundir las zonas de alta identidad inter-especie como lo son las ribosomales de subunidad menor (Miller *et al.*, 2011). Por esta razón sólo 28 MAGs se pudieron ensamblar junto con su secuencia ribosomal 16S. Además, ocho de ellos contenían las regiones 5S y 23S. Estos MAGs de alta calidad pertenecen a los filos Firmicutes (2 MAGs), Bacteroidota, Thermotogota, Armatimonadota, Methanobacteriota, Patescibacteria y Desulfobacterota.

Los datos de abundancia de los MAGs se utilizaron para construir una red de co-ocurrencia, para evaluar si su variación también era capaz de reflejar los cambios en el régimen de alimentación, del mismo modo que se había realizado con los datos de abundancia del gen 16S rARN (Figura 17). La red construida con valores de correlación de Pearson superiores a 0,7 posee 162 nodos y 913 conexiones, una densidad de 0,07 y seguía una distribución de ley de potencia, característica de una red libre de escala.

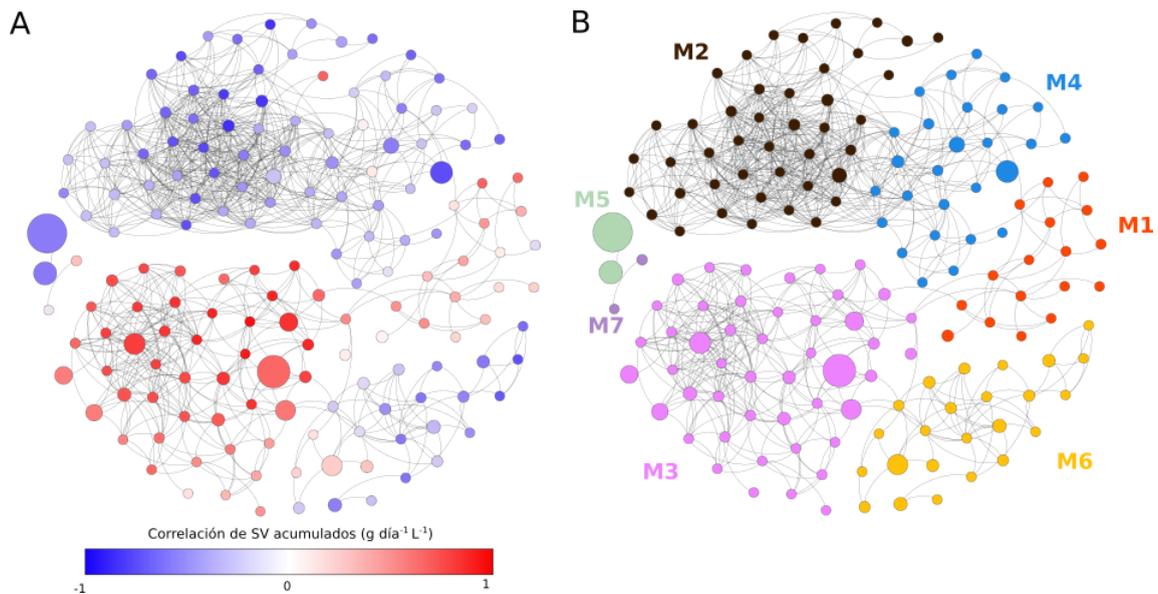


Figura 17: Red de co-ocurrencias basada en la correlación de Pearson de MAGs. El tamaño de cada nodo representa la abundancia máxima para toda la serie longitudinal. Las conexiones azul y rojo representan correlaciones significativas positivas y negativas, respectivamente (correlación $r > |0,7|$; $p < 0,001$). A) Los nodos se colorean de acuerdo con la correlación positiva (rojo) o negativa (azul) entre la cobertura del MAG y la carga total de sólidos volátiles normalizados. B) La misma red con nodos coloreados por módulo.

La red de co-ocurrencia reveló un cambio en la composición de la comunidad debido al cambio en la concentración de SV y la composición del sustrato similar al obtenido a partir de las OTUs basadas en la secuencia del gen ribosomal 16S (Figura 17-A). La correlación reveló la presencia de siete módulos altamente conectados, con un índice de modularidad de 0,51 (Fig 17-B). Dos módulos, M2 y M3, contenían juntos casi el 56 % del total de nodos. Estos dos módulos dominaron en muestras con valores contrastantes de contenido de RA. M3 fue caracterizado como el módulo de alto RA por su alta correlación al agregado de este tipo de alimento y M2 el módulo de bajo RA (Figura 18).

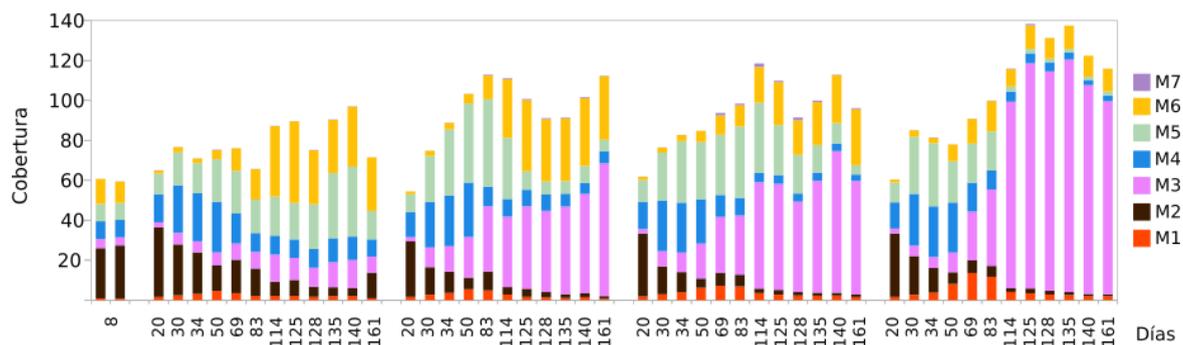


Figura 18: Abundancia en el transcurso del tiempo de los MAGs pertenecientes a los siete módulos de la red que se muestran en el panel B. Las dos primeras barras son muestras duplicadas correspondientes a ocho días después del inicio del experimento.

Ambos módulos estuvieron representados por MAGs hidrolíticos, fermentativos y metanogénicos (ver Apéndice: Tabla 1). El módulo M2 incluyó MAGs hidrolíticos/fermentativos pertenecientes a diferentes filos como Bacteroidota (9 MAGs) y Cloacimonadotas (2 MAGs), y varias bacterias fermentativas de diversos filos, como Actinobacteria (10 MAGs), Firmicutes_A (4 MAGs en la clase Clostridia), Armatimonadota, Chloroflexota, Patescibacteria (3 MAGs), Proteobacteria (5 MAGs) y Verrucomicrobiota. El módulo M2 también contenía bacterias sintróficas pertenecientes a la familia *Syntrophomonadaceae* (MAG.163 y MAG.182), Synergistota (MAG.198) y el género *Syntrophosphaera* (MAG.199), y las arqueas metanogénicas *Methanosarcina vacuolata* (MAG.97). El módulo 3, que contenía MAGs de alta abundancia en condiciones de alto RA, también comprendía una gran diversidad de microorganismos capaces de realizar todas las funciones implicadas en la digestión anaeróbica. M3 estuvo dominado por bacterias hidrolíticas pertenecientes a varios filos, como Bacteroidota (4 MAGs), Synergistota (2 MAGs), Actinobacteriota (3 MAGs), Firmicutes (4 MAGs), Spirochaetota (3 MAGs), Chloroflexota (2 MAGs), Fusobacteriota, Patescibacteria y Myxococcota. Estos filos, así como Verrucomicrobiota, Planctomycetota y Eremiobacteriota, incluyen

principalmente MAGs de bacterias fermentativas. El módulo M3 también contenía bacterias sintróficas dentro del filo Firmicutes_B (MAG.146, f:*Pelotomaculaceae* y MAG.127, f:*Syntrophomonadaceae*), además de cinco metanógenos: MAG.153, g:*Methanospirillum*, MAG.191, f:*Methanomethylophilaceae*, MAG.321, g:*Methanospirillum*, MAG.187, *Methanotherix soehngeni* y MAG.172, g:*Methanoculleus* (ver Apéndice Tabla 1).

Para corroborar que la reconstrucción de los 196 genomas a partir de los metagenomas correspondía a una fracción representativa de la comunidad se realizó una tercera red de co-ocurrencia que incluyó OTUs y MAGs combinados. El método utilizado fue el mismo que para las redes de OTUs y MAGs por separado. Se filtraron las correlaciones con un coeficiente de Pearson mayor a 0,7, resultando en una red de 462 nodos y 4685 conexiones. De los 192 MAGs, 190 estuvieron representados en la red, mientras que 272 nodos pertenecían a OTUs. De este modo se pudieron visualizar 28 MAGs que no se habían podido detectar en la red de co-ocurrencia de MAGs y 41 OTUs que no se habían visto previamente. Se detectaron en total 17 módulos con una resolución 2 y un índice de modularidad de 0.635, aunque el 93 % del total de los nodos estuvieron contenidos en tan solo 5 módulos (Figura 19).

Los MAGs pertenecientes a los módulos de bajo y alto RA en la red de MAGs, identificados respectivamente en 2 módulos distintos de la red de OTUs-MAGs se nombraron con la misma nomenclatura en la Figura 17. Dos MAGs de M3 (módulo de alto RA - Figura 17 B), MAG.103 (*Synergistetes* f:*Aminiphilaceae*) y MAG.30 (*Bacteroidota* f:*Prolixibacteraceae*) se asociaron a un módulo distinto (módulo 7, Figura 19). Igualmente, cuatro MAGs de M2 (módulo de bajo RA), MAG.14

(Chloroflexota g:*Promineofilum*), MAG.204 (Patescibacteria o:Saccharimonadales), MAG.107 (Armatimonadota f:*Fimbriimonadaceae*) y MAG.25 (Actinobacteriota s:*Microthrix parvicella*) no pertenecían al mismo módulo que el resto de los MAGs del módulo 2, sino que al módulo 1 en la red de OTUs-MAGs (Figura 19-B).

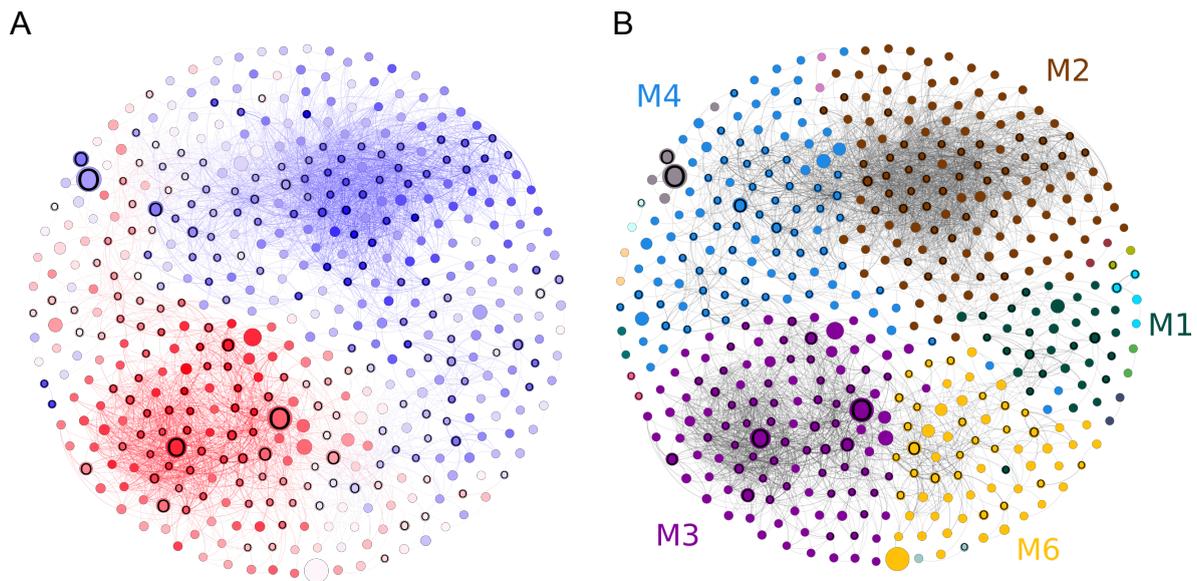


Figura 19: Red de co-ocurrencias basada en la correlación de Pearson de MAGs y OTUs. El tamaño de cada nodo representa la abundancia máxima para toda la serie temporal. Las conexiones correlaciones significativas positivas (correlación $r > 0,7$; $p < 0,001$). Los círculos negros en cada uno de los nodos corresponden a MAGs. A) Los nodos se colorean de acuerdo con la correlación positiva (rojo) o negativa (azul) entre la cobertura del MAG/OTU y la carga total de sólidos volátiles normalizados. B) La misma red con nodos coloreados por módulo.

A pesar de estas diferencias, la red de co-ocurrencia de OTUs-MAGs mostró una estructura muy similar a las redes construidas separadamente con OTUs y MAGs, lo que verifica que los MAGs corresponden a una fracción representativa de toda la comunidad microbiana.

Estudio funcional de la comunidad

La red de co-ocurrencia de MAGs reveló un cambio en la comunidad, y para conocer qué genes estaban involucrados, se estudió a nivel funcional los diferentes organismos del microbioma. Dado que el sustrato contenía una gran proporción de carbohidratos complejos y en menor medida proteínas y lípidos, se orientó la búsqueda hacia la producción de exoenzimas hidrolíticas. Se predijeron las proteínas extracelulares y de membrana y se buscaron homologías con enzimas hidrolíticas en bases de datos específicas. En el caso de la degradación de carbohidratos se utilizó la base de datos CAZy mientras que para la predicción de enzimas degradadoras de proteínas se contrastó con la base de datos MEROPS. Las lipasas se detectaron mediante la base de datos LED. En total se detectaron 229 enzimas activas para carbohidratos (CAZymas), 54 peptidasas y 121 lipasas diferentes. La abundancia total de cada uno de estos 3 grupos de polímeros se muestran en la figura 20, en donde se ve claramente que los genes que codifican para CAZymas dominan por sobre las lipasas y proteasas. El 72 % de las exoenzimas hidrolíticas estuvo representado por las CAZymas, mientras que el 17 % por lipasas y 11 % por proteasas. Estos datos son consistentes con la proporción de carbohidratos del alimento provisto a los reactores, dado que el 12,6 % del peso seco correspondían a hidratos de carbono, mientras que el contenido de proteínas y lípidos en el alimento era de 3,2 % y 0,6 % del peso seco respectivamente.

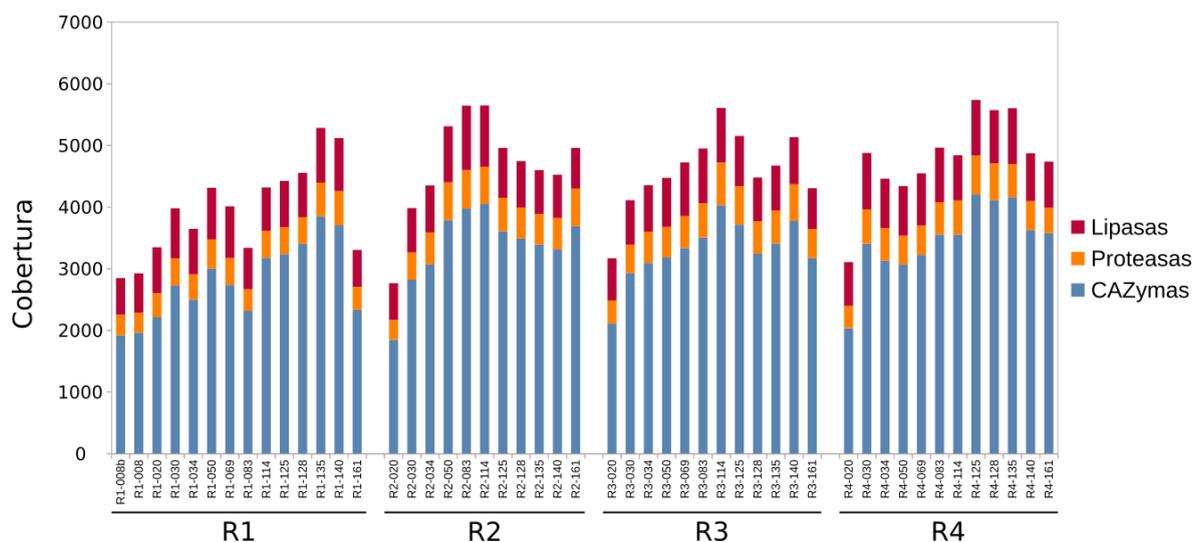


Figura 20: Abundancia total de genes extracelulares de lipasas, proteasas y enzimas activas de carbohidratos (cazymas).

Para analizar si la abundancia de los genes que codifican para la degradación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos presentaba relación con las característica de la alimentación, las muestras se dividieron en 2 grupos: las que recibieron RA y aquellas que sólo recibieron lodos mixtos (20 muestras en cada caso). Las diferencias obtenidas en cada caso fueron significativas ($p < 0,01$) (Figura 21).

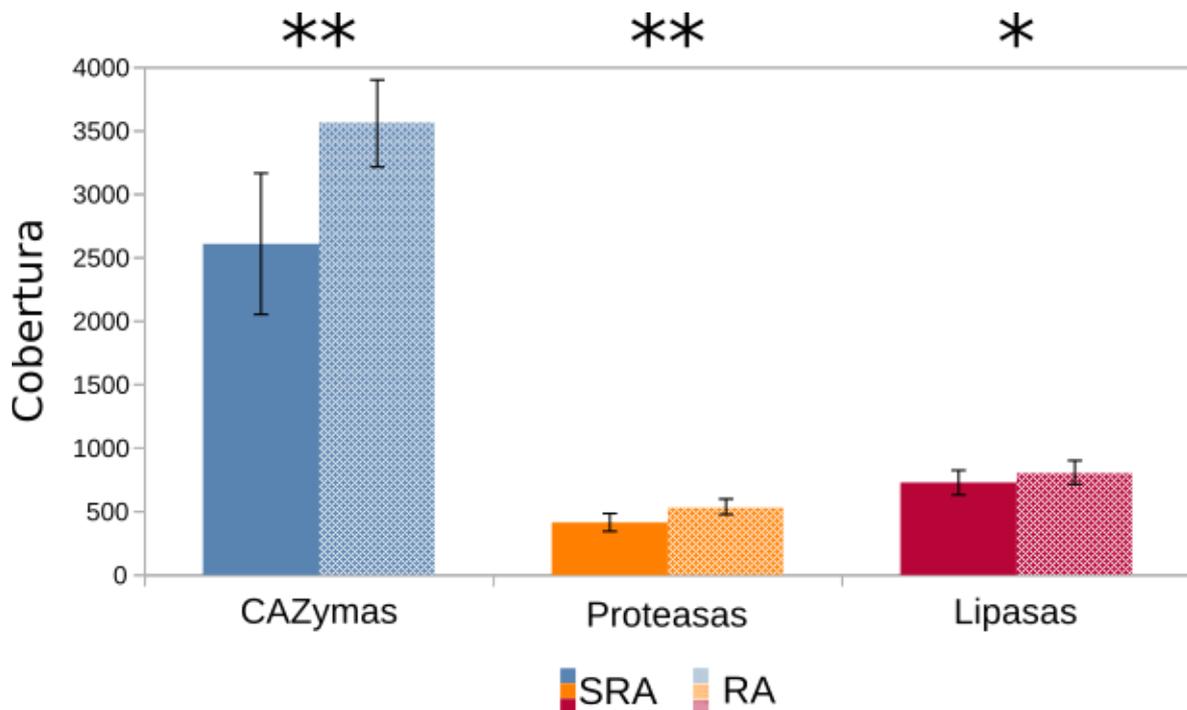


Figura 21: Abundancia promedio de las enzimas extracelulares encargadas de degradar carbohidratos (cazymas), proteasas y lipasas agrupadas en dos conjuntos de muestras diferentes: muestras sin residuo de alimento (SRA) y con residuo alimenticio (RA). Se analizaron si las diferencias dentro de cada grupo son significativas (ANOVA) con un valor p menor a 0.01 (*) y menor a 0.001 (**).

El aumento de MAGs hidrolíticos está asociado al cambio de alimentación

Con el objetivo de identificar las bacterias hidrolíticas, se buscaron las enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy) en cada uno de los MAGs. La abundancia total de las familias de glucósidos hidrolasas (GH), glucosil transferasas (GT), polisacáridos liasas (PL) y carbohidratos esterases (CE) presentes en los MAGs aumentó en los digestores con una mayor concentración de RA. Dado que los carbohidratos deben ser degradados a moléculas más simples para poder ingresar a las células, el estudio estuvo centrado en la presencia de enzimas GHs, PLs y CEs extracelulares. La clase GH fue la más abundante en todas las muestras en comparación con el resto de las CAZymas (Figura 22). Veintidós de las 146 enzimas

activas de carbohidratos extracelulares presentes en el conjunto de datos metagenómicos correlacionaron con la concentración de residuos de alimentos ($r > 0,65$, $p < 0,001$). De las 22 enzimas que correlacionaron con la concentración de RA, 15 participan en la degradación de alginato, celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, galactano e inulina. Estos carbohidratos son los componentes principales de las paredes celulares de las plantas y también se encuentran como almacenamiento de alimentos vegetales (Gilbert et al., 2013), es decir son componentes abundantes del residuo de alimento. Las diferentes enzimas extracelulares que correlacionaron con la concentración de RA, tales como la enzima ramificadora del almidón (EC 2.4.1.18), pululanasa (EC 3.2.1.41), fosfato-alfa-maltosil-transferasa (EC 2.4.99.16), β -amilasa (EC 3.2.1.2), exo-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), α -fucosidasa (EC 3.2.1.51) y α -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.49), estaban presentes en MAGs de diferentes filos, como Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexota, Firmicutes, Fusobacteriota, Spirochaetota y Verrumicrobiota (Fig 23). Juntos, estos MAGs hidrolíticos, que también correlacionaron con RA, representaron casi la mitad de los nodos en el módulo 3 de la figura 19-B.

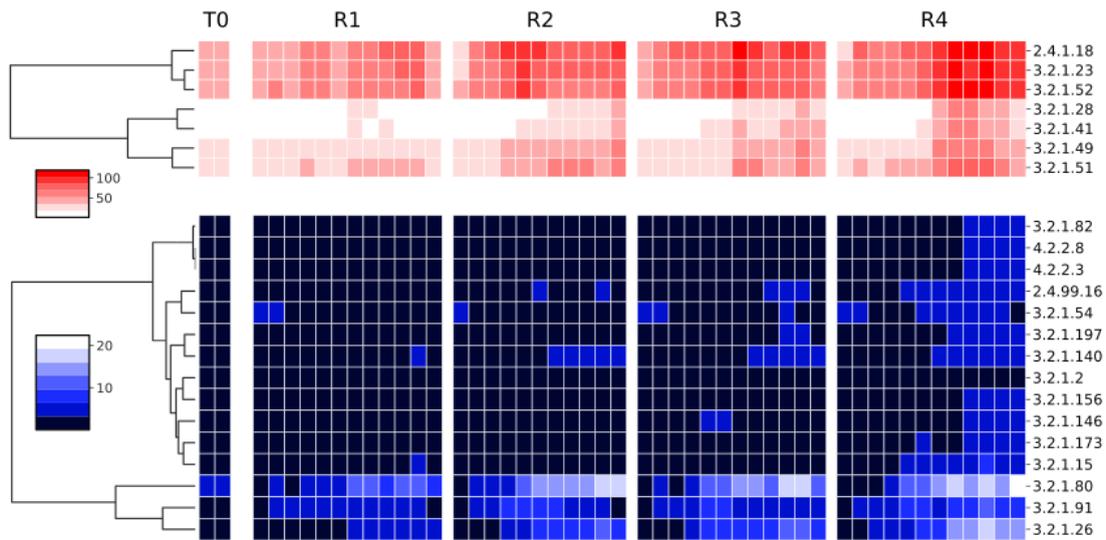


Figura 22: *Heatmap* de enzimas hidrolíticas presentes en MAGs que correlacionaron significativamente con SV acumulados. La abundancia de enzimas hidrolíticas identificadas en todos los MAGs, expresada como la suma de la cobertura de *contigs*. Para mayor claridad, el *heatmap* se dividió en dos escalas diferentes, ambas comenzando desde 0.

Se podría pensar que la correlación de las enzimas hidrolíticas analizadas con el RA implique una correlación entre este tipo de sustrato y los MAGs que contienen los genes que secretan estas enzimas. Sin embargo, las enzimas hidrolíticas analizadas no eran exclusivas de los MAGs mencionados en la figura 23. En muchos casos, la abundancia de MAGs que no correlacionaron con el RA está incluida en la cobertura total de estos genes. En otras palabras, los resultados indican que las enzimas hidrolíticas tienen una mayor abundancia en las muestras con RA y están contenidas en un grupo específico de MAGs funcionalmente relevante.

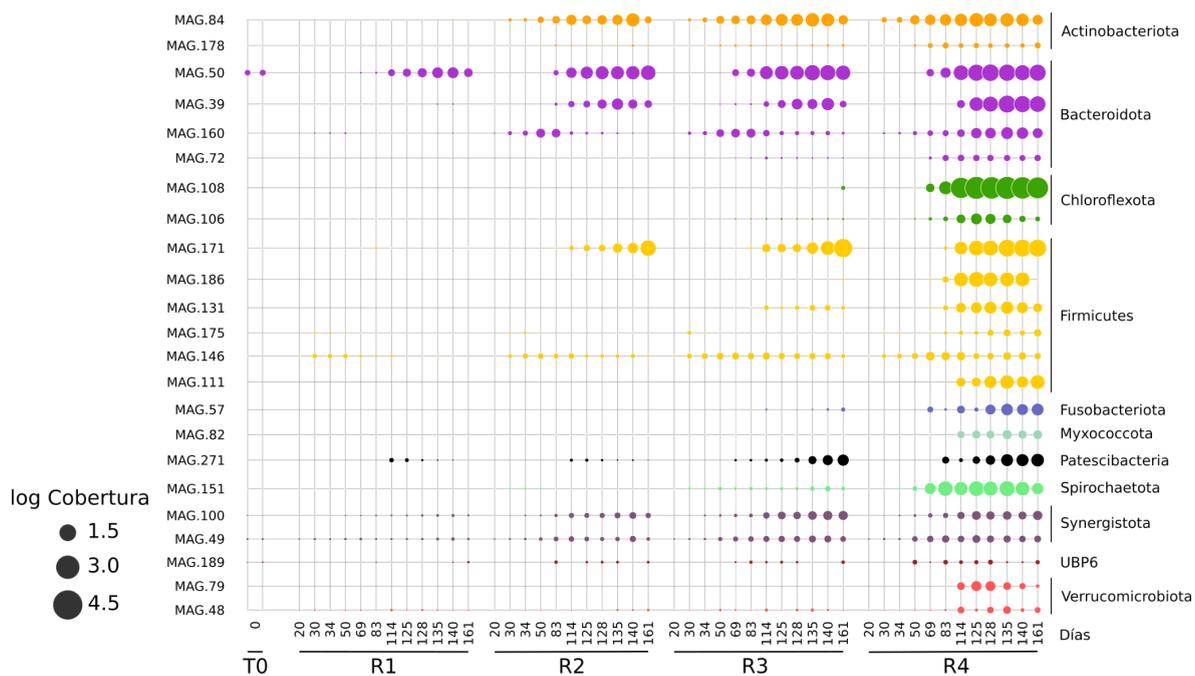


Figura 23: Evolución temporal de la abundancia de MAGs que contienen las enzimas hidrolíticas que se muestran en la figura 22. Los MAGs están coloreados por filo. El tamaño del círculo es proporcional a la cobertura en cada muestra.

También se analizaron en detalle los genes que codifican enzimas que degradan proteínas utilizando la base de datos *MEROPS*. Solamente se conservaron aquellas peptidasas que tuvieron un valor de identidad mayor al 50 % y un e-valor (*e-value*) menor a 0,001. De las 54 familias identificadas, las 4 más abundantes tuvieron el 40 % de la abundancia total. La familia más abundante (M23), con el 14 % de la cobertura total de peptidasas, contiene endopeptidasas que lisan los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana como mecanismo de defensa o como forma de nutrición de la bacteria. La segunda familia de exo-peptidasas más abundante presente en los MAGs se trata de la familia S08 (12 % del total de las enzimas degradadoras de proteínas identificadas), siendo una familia que contiene a las subtilisinas (serina endopeptidasa) y sus homólogos. La familia M16 representa el 7 % de abundancia total de las peptidasas y es la tercera familia más

abundante. Es una familia de metalo-endopeptidasas y su función es diversa en bacterias. Está involucrada en la degradación de pequeños péptidos (pitrilina), puede estar involucrada en la biosíntesis de la coenzima pirrol-quinolina-quinol degradando pequeños péptidos liberando así glutamato y tirosina que son necesarios para la síntesis de esta coenzima. La familia M14 incluye metalo-carboxipeptidasas, y la mayoría de las peptidasas de esta familia hidrolizan aminoácidos carbonos-terminales de polipéptidos. La familia M23 es la única de las mencionadas anteriormente que correlacionó positivamente con los sólidos volátiles acumulados ($r = 0.71$, $p < 1 \text{ e-}3$). Además, otras 9 familias de peptidasas correlacionaron positivamente con el residuo de alimento, entre ellas S09, S01 y S46 con una abundancia relativa entre 6 y 7 % del total de las peptidasas.

Se identificaron hasta 22 familias diferentes por cada MAG. Dos genomas dentro de los MAGs con un mayor número de familias (mayor a 10 familias) correlacionaron positivamente con el RA ($r > 0,65$). MAG.72, perteneciente al filo Bacteroidetes (g:*Lentimicrobium*), contiene 15 peptidasas diferentes y el MAG.84 (filo Actinobacteriota, género *Ancrocorticia*) posee 11 enzimas diferentes capaces de degradar péptidos. Ambos MAGs se encuentran en el módulo M3 de la red de co-ocurrencias de MAGs (Figura 19-B), correspondiente al de alta proporción de residuos de alimentos. Por el contrario, la mayoría de los MAGs que poseen una alta cantidad de diferentes peptidasas correlacionaron negativamente con el RA.

La gran mayoría de los MAGs (183 de 196) codifican enzimas capaces de degradar lípidos extracelulares. Sin embargo, sólo siete genes correlacionaron positivamente con el SV acumulado ($r > 0,65$, valor $p < 0,001$). Estas enzimas fueron clasificadas dentro de cuatro familias diferentes de carboxilesterasas, un gen similar a la *lipasa A*

de *Candida antarctica*, una *prolil-endopeptidasa* y una lipasa bacteriana general. Los MAGs que contenían un mayor número de lipasas pertenecían al módulo M2 (es decir, módulo de bajo RA - Figura 19-B). Actinobacteriota fue el filo con un mayor número de representantes que contenían más lipasas que el resto de los MAGs. MAG.129 (f:*Ilumatobacteraceae*), MAG.25 (*Microthrix parvicella*), MAG.29 (g:*Microthrix*), MAG.35 (f:*Microtrichaceae*), MAG.8_A y MAG.8_B (g:*Gordonia*). MAG.16 (f:*Obscuribacteraceae*) es otro MAG perteneciente a M2 con alta proporción de lipasas. Por el contrario, solo se encontró un MAG en M3 (MAG.30 f:*Prolixibacteraceae*) del subconjunto de MAG con alta proporción de lipasas. Otros dos MAGs (MAG.12 p:OLB16 y MAG.13 o:Sedimentisphaerales) que pertenecían al módulo M6.

Los compuestos presentes en los residuos de alimento proporcionan nuevos nichos ecológicos

El aumento en la concentración de residuo alimenticio se asoció a una mayor abundancia de enzimas pectinolíticas, como las *hidrolasas poligalacturonasas*, (EC: 3.2.1.15, 3.2.1.82), *β -galactosidasa* (EC 3.2.1.23) y *ramnogalacturonano I galactohidrolasa* (EC 3.2.1.173).

Las pectinas están presentes en las paredes celulares de las plantas de frutas y verduras y también se utilizan ampliamente en diferentes productos de la industria alimentaria (Willats *et al.*, 2006). Químicamente, las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos altamente heterogéneos y ramificados, ricos en ácidos D-galacturónicos. Contienen regiones "lisas" de homogalacturonano (HG) y segmentos altamente ramificados en la región "hairy o ramificada" (Caffall y

Mohnen, 2009). Debido a su complejidad, la degradación de las pectinas involucra diversas endo y exo-enzimas, que degradan el “esqueleto” o la cadena lateral (Wong, 2008).

Un solo MAG, perteneciente al género *Proteiniphillum* (MAG.39) contenía en su genoma la vía completa de degradación de la pectina (Fig 24). La abundancia de *Proteiniphillum* aumentó con una mayor concentración de RA y no se detectó en el reactor control (Fig. 23). El MAG *Proteiniphillum* codifica *PemA* y *PeaY*, dos esterasas responsables de la desmetilación y desacetilación de la cadena lineal de galacturonanos conectados entre sí por enlaces alfa-(1,4). El poligalacturonato resultante es hidrolizado mediante un conjunto de endo-pectato liasas (*peI/ABCDEILZ*), interviniendo en la degradación de los poligalacturonanos, liberando así oligalacturonato insaturado. Los oligogalacturonatos parcialmente degradados en el periplasma pueden introducirse al citoplasma mediante un transportador. En otra vía, una de las ramas de la pectina, la rama principal del ramnogalacturonano, es escindida por una enzima de secreción externa llamada *RhiE*, lo que permite que los ramnogalacturónidos insaturados (uRha) se difundan en el periplasma (BeMiller, 1986; Kontogiorgos, 2020).

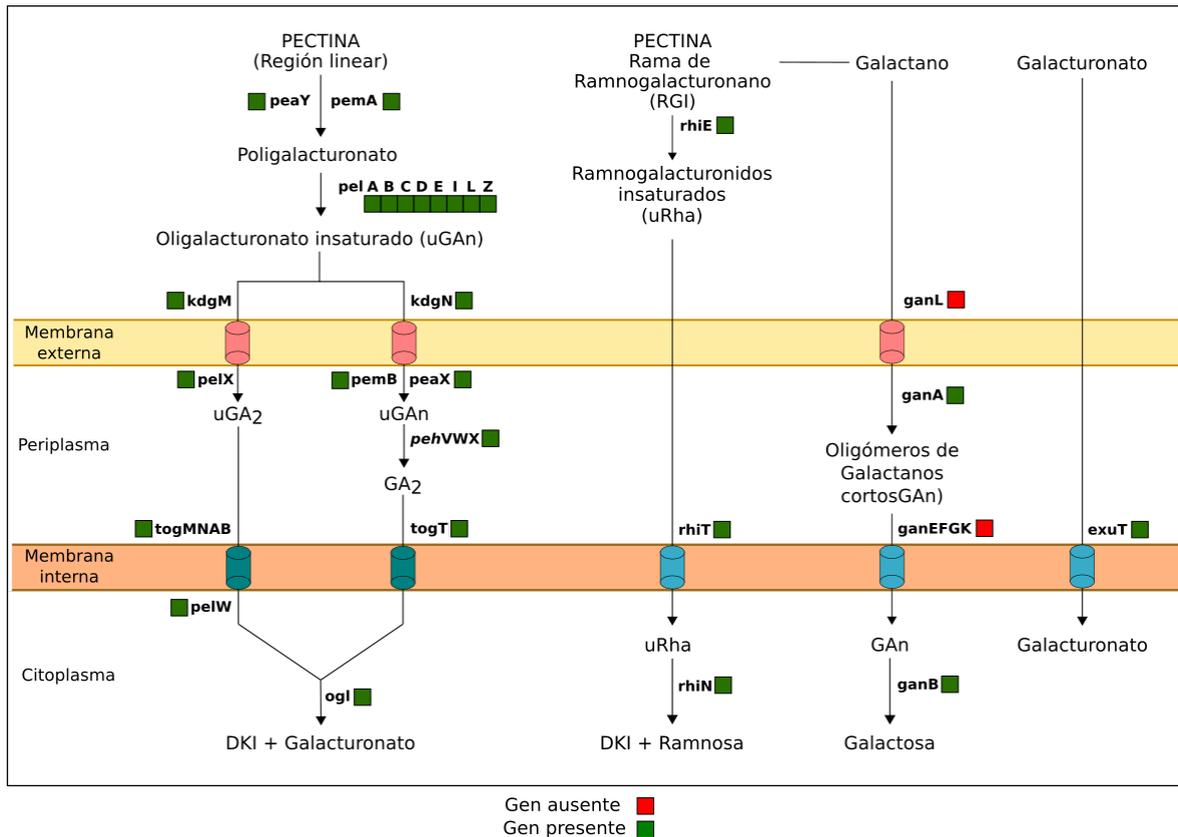


Figura 24: Vía de degradación de la pectina. Los recuadros verdes indican que el gen está presente en MAG.39, mientras que un recuadro rojo indica que no se ha detectado el gen.

Las enzimas extracelulares de degradación de la rama principal de la pectina y ramnogalacturonano (*peaY*, *pemA*, *pelA B C D E I L Z* y *rhiE*) también se encontraron en otros 10 MAGs, pertenecientes a los filos Bacteroidota (5), Fibrobacterota (2), Firmicutes, Planctomycetota y Verrumicrobiota, pero no los transportadores *kdgM* y *kdgN* que solo se encontraron en el MAG.39. *Proteiniphilum* fue la bacteria con mayor abundancia entre los organismos capaces de degradar la pectina, seguido por otros 3 MAGs pertenecientes también al filo Bacteroidota, MAG.30 (familia *Prolixibacteraceae*), MAG.73 (clase Bacteroidales) y el MAG.98 (clase Bacteroidales).

Otra función fisiológica importante de *Proteiniphilum* es la degradación de proteínas (Hahnke *et al.*, 2016). El MAG.39 posee diferentes enzimas involucradas en la

degradación de diversas proteínas que poseen prolina N-terminal, lisina y arginina (EC 3.4.11.9 y EC 3.4.11.15). Además, los compuestos dipeptidil, D-alanil-D-alanina y muramil-tripéptido carboxipeptidasas (EC 3.4.15.5, EC 3.4.16.4 y EC 3.4.17.13) son enzimas que se encuentran en el genoma de MAG.39. Las aminopeptidasas y la alfa-aspartil dipeptidasa también están codificadas por el MAG *Proteiniphilum* (EC 3.4.22.40 y EC 3.4.13.21).

La metanogénesis depende de un conjunto diverso y dinámico de interacciones sintróficas

La reconstrucción de genomas a partir de metagenomas permitió obtener 18 MAGs de arqueas. La abundancia de este dominio comprendía aproximadamente del 7 % del total de los MAGs, similar a lo que se encuentra típicamente en otros reactores metanogénicos (Treu *et al.*, 2016b; Xu *et al.*, 2018).

La proporción de metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos se distribuyó uniformemente en todo el rango de SV. Sin embargo, un solo metanógeno (*Methanotherix soehngenii*, MAG.187) dominó la conversión de acetato en metano en todo el rango de concentraciones de co-sustrato, mientras que diferentes metanógenos hidrogenotróficos se repartieron entre módulos asociados a SV alto (M3) y bajo. (M2 en la figura 19-B).

Se realizó un análisis de correlación canónica (CCA por sus siglas en inglés) utilizando la abundancia de 9 arqueas hidrogenotróficas a partir del día 69 en cada uno de los reactores (Figura 25). Las abundancias de *Methanoculleus* (MAG.172) y tres *Methanospirillum* (MAG.153, MAG.321 y MAG. 32_A) correlacionaron positivamente con la acumulación de SV. La abundancia de estos cuatro

metanógenos hidrogenotróficos mostró una correlación positiva con *Syntrophomonadaceae*, una bacteria oxidante de butirato (MAG.127) y *Pelotomaculaceae*, una bacteria oxidante de propionato (MAG.146, Fig 26), lo que sugiere potenciales relaciones sintróficas .

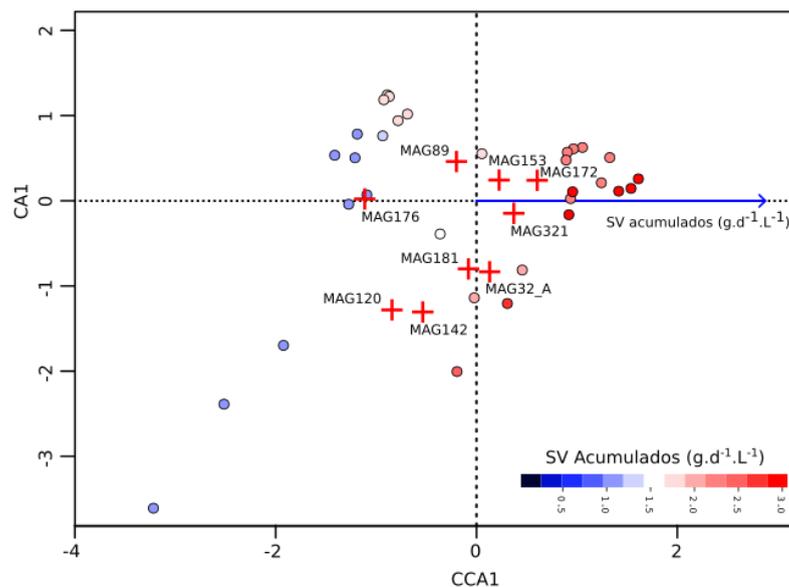


Figura 25: Variación de arqueas hidrogenotróficas y asociación con bacterias sintróficas. Análisis de correlación canónica de arqueas hidrogenotróficas. Las muestras se indican con símbolos, los MAGs se muestran como cruces. El *heatmap* indica la correlación entre la cobertura del MAG y la carga total de sólidos volátiles normalizados.

Por el contrario, un organismo sintrófico oxidante de butirato de la familia *Syntrophomonadaceae* (MAG.166) correlacionó positivamente con otro *Methanospirillum* (MAG.120) y dos *Methanosphaerulaceae* (MAG.142 y MAG.181). Otros oxidantes sintróficos de AGV pertenecientes al filo Desulfobacterota correlacionaron con MAG.176: f:*Methanoregulaceae* y MAG.89, f:*Methanosphaerulaceae*.

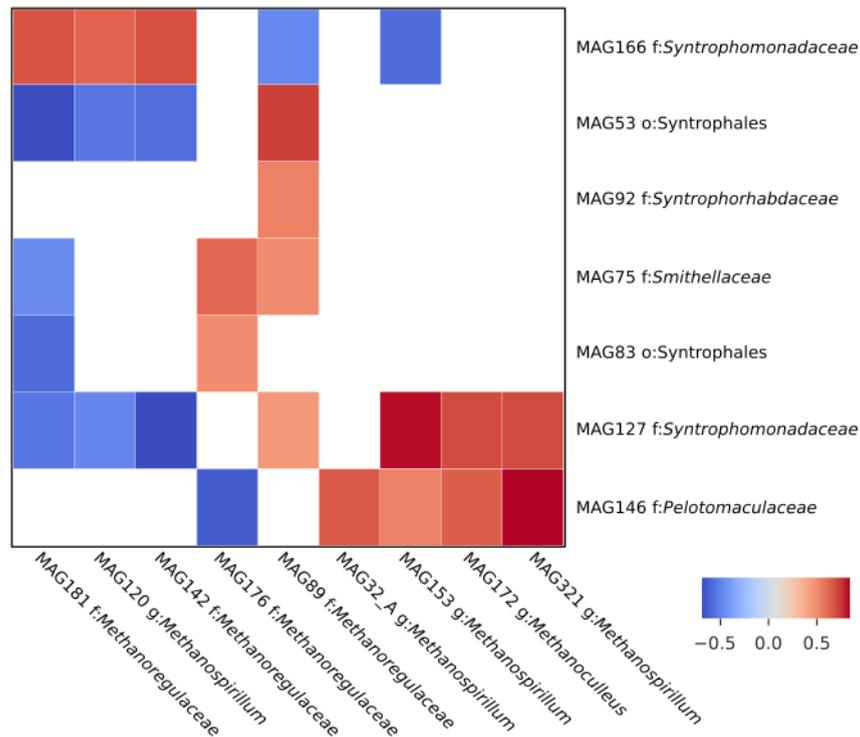


Figura 26: Correlación entre bacterias sintróficas y arqueas hidrogenotróficas. El *heatmap* muestra solo interacciones con correlación significativa ($p < 0,001$).

Análisis de balances de flujos

Diferentes técnicas de ensamblado y binning proporcionan un mayor número de MAGs de alta calidad

Con el objetivo de conocer los diferentes potenciales sustratos que pueden utilizar cada uno de los miembros de la comunidad y las interacciones entre ellos se utilizó el análisis de balances de flujos (ABF). Este método, a diferencia del estudio funcional realizado anteriormente, necesita de MAGs con un alto porcentaje de completitud (al menos 90 % completo). Por este motivo se realizaron nuevos ensamblados del metagenoma y agrupaciones de los *scaffolds* (*binning*) por medio de una combinación de diferentes programas bioinformáticos. Se lograron reconstruir 104 MAGs de alta calidad, aumentando así el porcentaje de MAGs con al

menos un 90 % de completitud. Posteriormente se desreplicaron todos los MAGs obtenidos con una base de datos de 10 mil MAGs reconstruidos a partir de la secuenciación de ADN de diferentes reactores anaeróbicos (Campanaro *et al.*, 2020). En definitiva se obtuvieron 138 MAGs que representan el 55,18 % del total de las lecturas secuenciadas y el 77 % de la comunidad con respecto a las lecturas ensambladas.

La comunidad microbiana del set de MAGs con un alto porcentaje de completitud estuvo representada por 27 filos diferentes. Los filos con mayor número de representantes corresponden a Bacteroidota con 29 MAGs, Firminutes_A (18 MAGs), Desulfobacterota (12 MAGs), Actinobacteriota (10 MAGs) y 9 arqueas pertenecientes al filo Halobacteriota.

La tasa de crecimiento y la producción de metano sirvieron como controles positivos en la contrastación de los modelos metabólicos

Se utilizaron los datos de composición del residuo de alimento (materiales y métodos - Tabla 1) y bibliográficos para determinar el medio y utilizarlo en el paso de *gapfilling* para completar el modelo metabólico. Se calcularon los flujos de compuestos que ingresan en los MAGs en cada una de las muestras que se encontraban presentes con abundancias relativas mayores a 0,1 %. Se calculó la tasa de crecimiento a partir de todos los flujos que contribuyen al aumento de biomasa de cada organismo (Figura 27). La tasa de crecimiento de las arqueas fue variable durante toda la serie temporal. MAG:AgMethanothrix_001¹ tuvo valores

¹ La nomenclatura para MAGs con una completitud muy alta (> 90 %) se dispuso de la siguiente manera: la primer letra para indicar el reino (A para arqueas y B para Bacterias), seguido de la inicial de la máxima categoría taxonómica al que se logró clasificar (p: filo, c: clase, o: orden, f: familia y g: género) junto con el nombre del taxón, terminando con un guión bajo y un número entre 001 y 138 para separar los 138 MAGs.

entre $0,26 \text{ h}^{-1}$ y $2,20 \text{ h}^{-1}$. Otros metanogénicos, del género *Methanomassiliicoccus* (MAG:AgMethanomassiliicoccus_011) y *Methanoculleus* (MAG:AgMethanoculleus_009) tuvieron valores entre $0,007 \text{ h}^{-1}$ y $0,63 \text{ h}^{-1}$. Los filos Bacteroidota, Chloroflexota y Verrumicrobiota fueron los más variables. Tres MAGs del orden Bacteroidales (MAG:BoBacteroidales_110, MAG:BoBacteroidales_112 y el MAG:BoBacteroidales_115) y un MAG de la familia *Paludibacteraceae* (MAG:BfPaludibacteraceae_104) fueron los que mayor tasa de crecimiento presentaron dentro del filo Bacteroidota ($2,34$; $2,33$; $2,04$ y $2,03 \text{ h}^{-1}$ respectivamente). En el caso del filo Chloroflexota, tuvo un solo representante con alta tasa de crecimiento, en el rango de $1,6 \text{ h}^{-1}$ a $2,02 \text{ h}^{-1}$. Este organismo pertenece a la familia *Anaerolineaceae* (MAG:BfAnaerolineaceae_076). En forma similar, dentro del filo Verrumicrobiota, un unico MAG, BcKiritimatiellae_127 tuvo tasas de crecimiento dentro del rango $0,35$ - $2,22 \text{ h}^{-1}$.

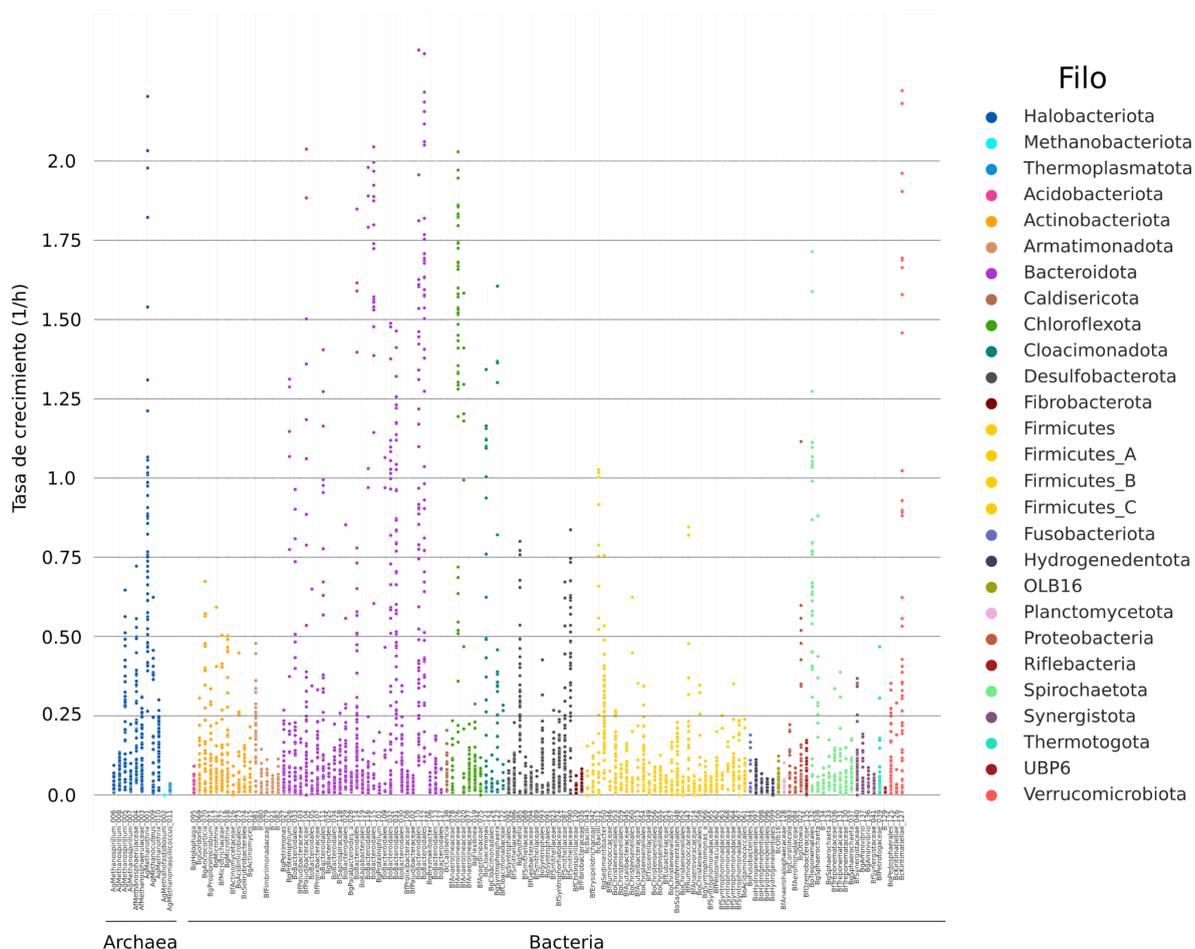


Figura 27: Tasa de crecimiento determinado por el software MICOM, utilizando el flujo “biomasa” y la abundancia del MAG en cada muestra.

La tasa de crecimiento calculada por el modelo metabólico se comparó con la tasa de crecimiento para cada MAG utilizando CoPTR, una técnica basada en la diferencia de cobertura entre el origen de replicación y terminación en el genoma (Figura 28). Los resultados de CoPTR mostraron un menor valor absoluto de la tasa de crecimiento, pero la misma tendencia para el filo Halobacteriota y los filos bacterianos Bacteroidota y Chloroflexota. Distinto fue el caso del filo Verrucomicrobiota, cuya tasa de crecimiento estimada por CoPTR no fue mayor a la del resto de los filos.

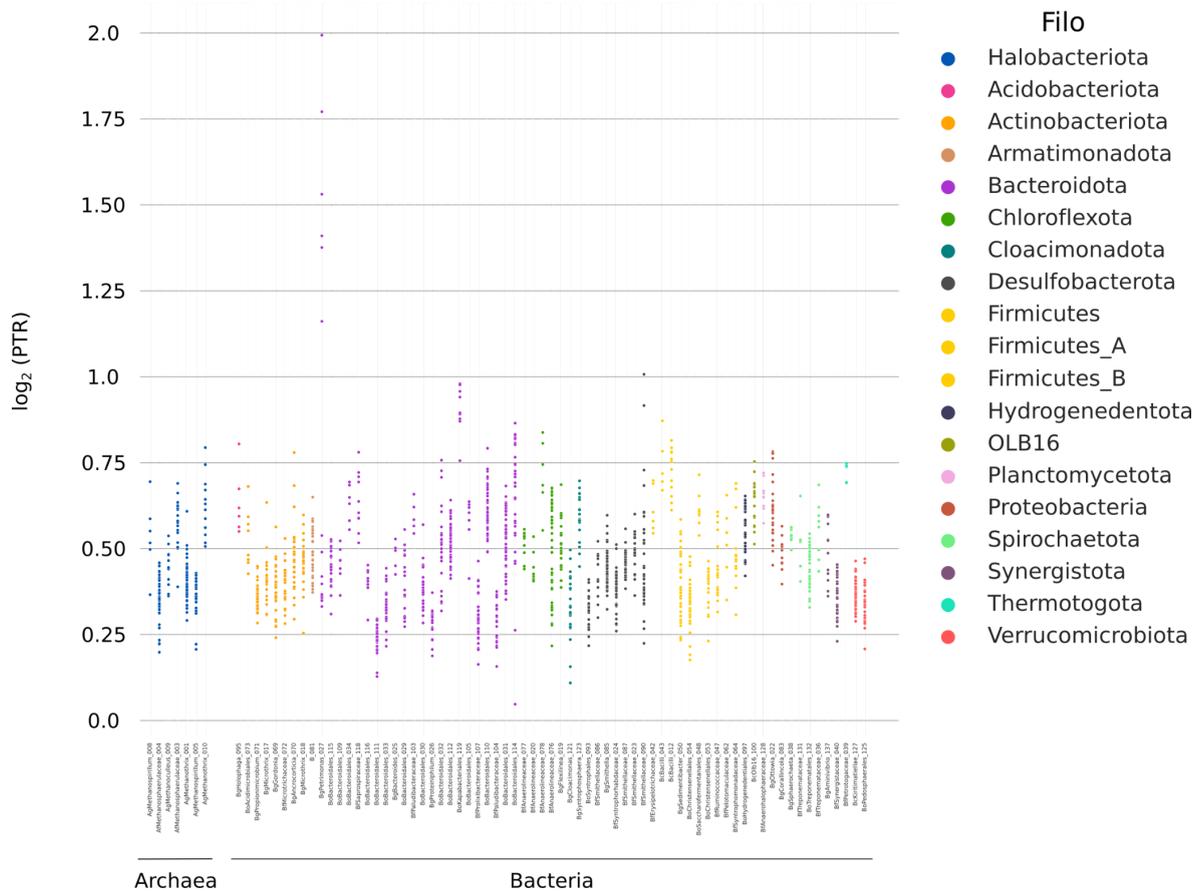
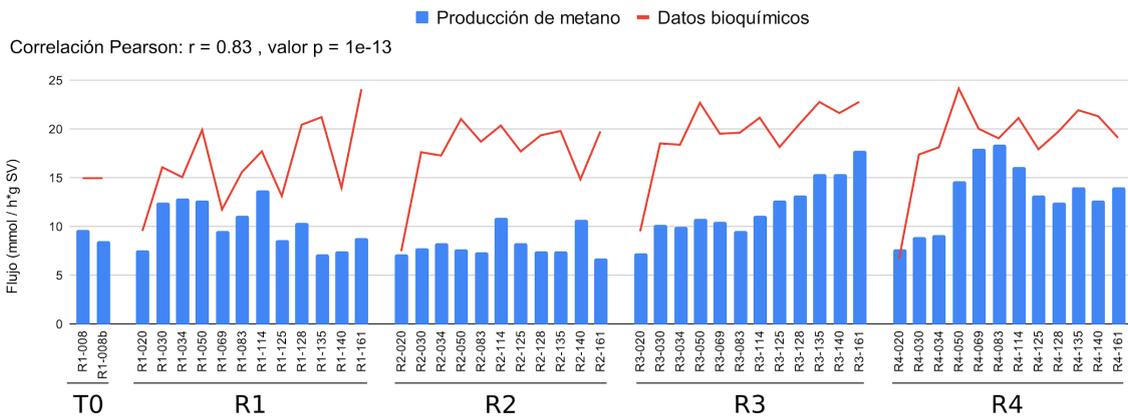


Figura 28: Estimación de la tasa de crecimiento a partir de la información de las lecturas mapeadas.

La tasa de crecimiento calculada por MICOM y CoPTR se correlacionaron obteniendo una correlación positiva significativa, con un coeficiente de Pearson de 0,52 ($p < 0.01$).

Otra forma utilizada para corroborar los resultados de ABF fue comparar diferentes datos bioquímicos medidos en los reactores a lo largo del experimento con los compuestos obtenidos en el modelo metabólico. En este caso se comparó la producción de metano con la medición de dicho gas durante el experimento. Se realizó una correlación Pearson entre ambos set de datos obteniendo un coeficiente de 0,83 con un valor p menor a 0,001 (Figura 29).

A



B

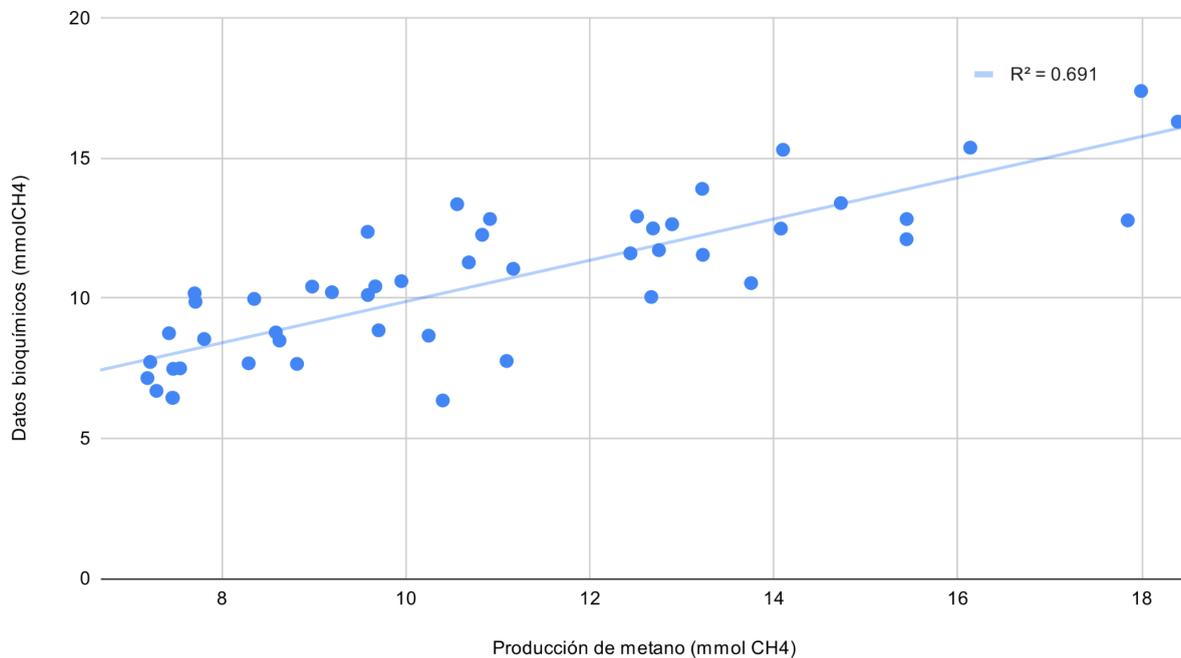


Figura 29: Producción de metano a lo largo del experimento. La medición se realizó estimando los mmoles de CH_4 por hora por los gramos de sólidos volátiles. Se graficaron las mediciones obtenidas experimentalmente en el laboratorio y los flujos obtenidos por el análisis de balance de flujo de la comunidad (A). Ambos resultados se ajustaron a una ecuación lineal, obteniendo un $R^2=0.691$ (B)

El uso de diferentes compuestos por los MAGs logró separar las muestras según el tipo de alimentación recibido

Al realizar el modelado metabólico, el medio está involucrado, ya sea entregando o recibiendo diferentes compuestos de los microorganismos estudiados. Para visualizar esta comunicación, se graficaron los flujos de metabolitos que participaron

con el medio. Por convención, el signo negativo significa la incorporación, mientras que positivo indica que hubo producción. De esta manera, se visualizó en modo de *heatmap* los metabolitos con mayor abundancia a lo largo de las 49 muestras que estuvieron intercambiando con el medio (Figura 30).

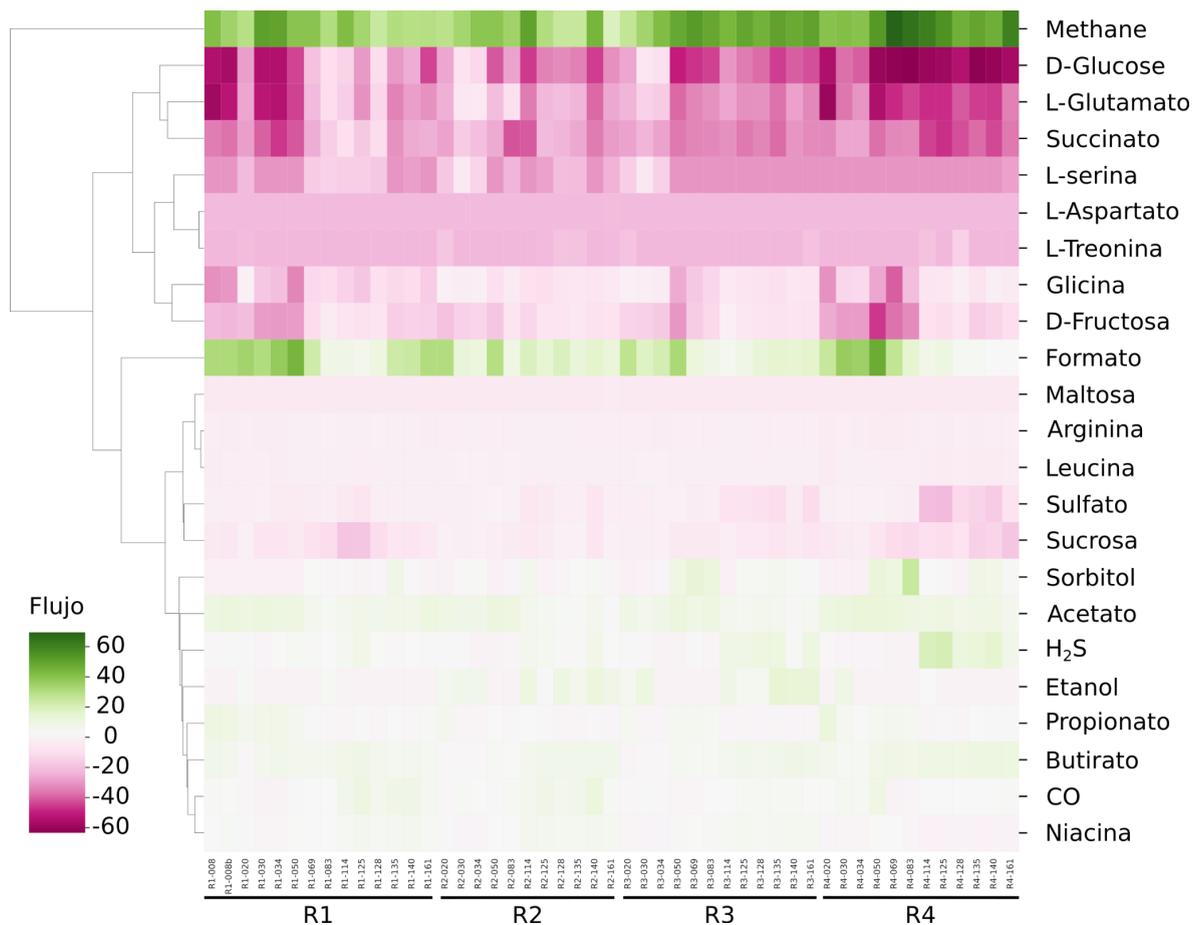


Figura 30: *Heatmap* de los flujos más abundantes del medio. Los valores negativos (Rosado) indica que el metabolito tiene sentido del medio a los MAGs. Color verde indica acumulación de compuestos en el medio.

La mayor producción de metabolitos correspondió al metano. Sin embargo, en las muestras con bajo RA, tuvo una gran importancia el formato. La concentración de ácidos grasos volátiles medida experimentalmente fueron utilizados para restringir el modelo metabólico de la comunidad, estimando las abundancias relativas de

propionato, acetato y butirato en digestores operando en forma estable (Cheng *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2019). El etanol tuvo valores de producción en los reactores R2 y R3, al principio y fin de cada serie temporal.

Los carbohidratos mostraron signos negativos, lo cual indica que los diferentes organismos incorporaron esos compuestos. El más abundante, la glucosa, mostró un perfil similar al agregado de RA, teniendo valores menores en las primeras muestras de cada reactor y un aumento marcado en los reactores 3, 4 y al final del experimento. Por su parte, el flujo de la fructosa mostró que hubo una mayor incorporación de este azúcar en muestras intermedias en cada uno de los reactores que recibió RA y en las primeras muestras del reactor control.

Varios aminoácidos estuvieron en el conjunto de metabolitos de gran abundancia de flujo, siendo el más importante el L-glutamato. La incorporación de este aminoácido por los diferentes MAGs estuvo dominada en las primeras muestras del reactor control y en el reactor 4.

Con el objetivo de analizar la respuesta del medio ante la presencia de todos los metabolitos y no solamente los más abundantes, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCA por sus siglas en inglés) con la información de los flujos de todos los compuestos que interaccionan con el medio (Figura 31). Este análisis demostró que los diferentes metabolitos que se están intercambiando entre los diferentes MAGs y el medio permite separar a las muestras según la proporción de residuo de alimento.

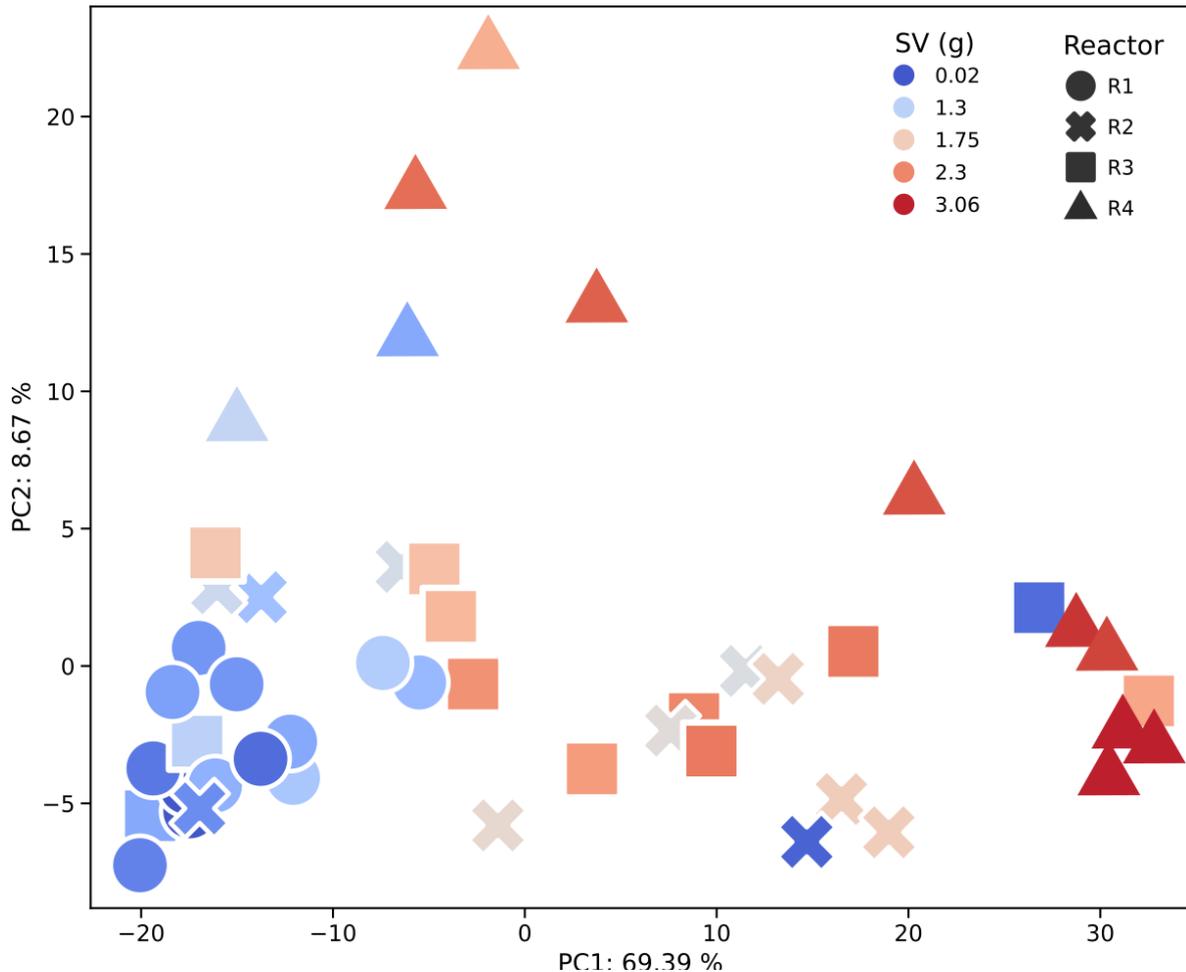


Figura 31: Análisis de coordenadas principales (PCA) de todos los flujos de metabolitos que interactúan con el medio.

Los flujos metabólicos de los MAGs permitieron agruparlos en nichos de crecimiento

Al observar una marcada heterogeneidad en la tasa de crecimiento dentro de cada filo, se decidió estudiar si los flujos de consumo de cada uno de los MAGs estaba relacionado filogenéticamente. Se visualizó en un gráfico de coordenadas, utilizando el algoritmo t-SNE (del inglés t-distributed stochastic neighbor embedding) sobre los flujos negativos, es decir aquellos compuestos que son importados, de cada uno de los MAGs en todas las muestras (Figura 32). Se observó que los filios mayoritarios Bacteroidota, Cloroflexota y Firmicutes no formaban una agrupación, sino que

estuvieron repartidos a lo largo de los dos ejes. Caso contrario fue el de las bacterias Desulfobacterota y las arqueas Methanobacteriota y Halobacteriota. Los organismos del filo Verrucomicrobiota y Synergistota no estuvieron próximas, pero a niveles taxonómicos inferiores se observó una separación entre las diferentes familias de cada filo.

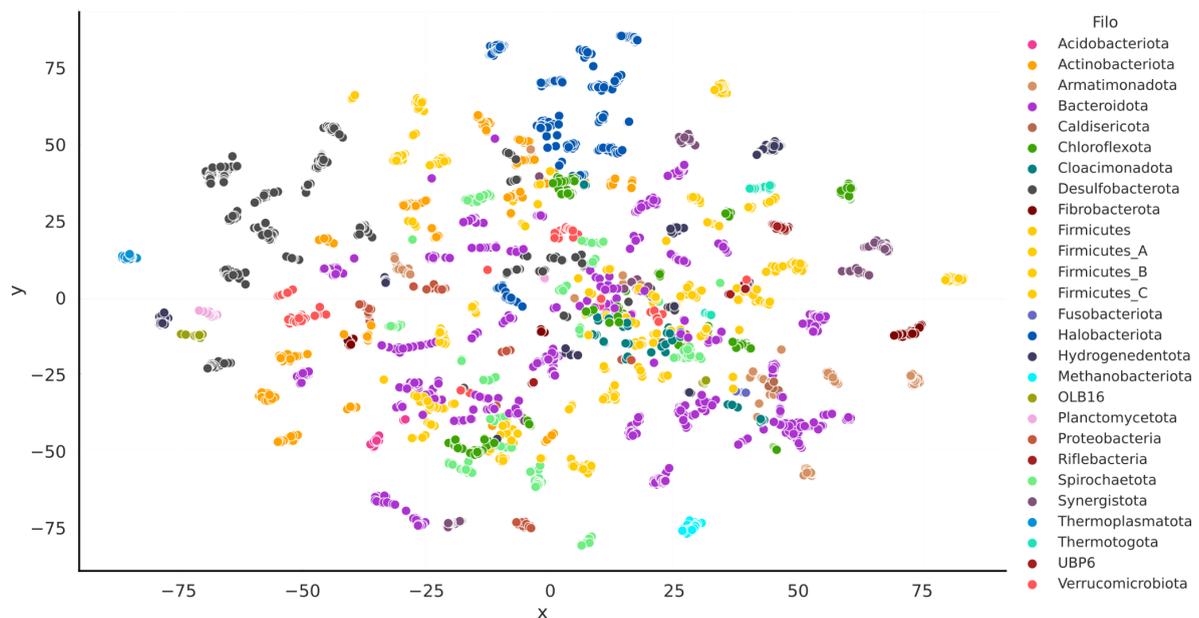


Figura 32: Nichos de crecimiento para cada filo. Los Flujos de consumo para cada MAG en cada muestra fue reducido a dos dimensiones utilizando el algoritmo t-SNE. Cada punto es un MAG en una muestra y los colores marcan los diferentes símbolos. MAGs que están más cerca que otros consumen un conjunto de metabolitos similares.

Para analizar en más detalle cada uno de los flujos de los MAGs se realizó un *knockout in silico*. El mismo consiste en remover un MAG en una muestra y re-calcular los balances de flujos de la comunidad. Si hay organismos que obtienen una tasa de crecimiento mayor a la calculada una vez que se retiró otro organismo, esto significa que ambos organismos compiten por los mismos recursos. En contraste, una tasa de crecimiento menor implica cooperatividad entre ambos organismos. Entre los 138 MAGs se detectaron 3.656 interacciones positivas y

MAGs con un coeficiente de Pearson mayor a 0,6 ($p < 0,001$). Con este filtrado las interacciones cooperativas y competitivas se redujeron 916 (365 y 551 respectivamente). Entre los filos con mayor número de interacciones se encontraron el filo Bacteroidota con 53 interrelaciones cooperativas y 91 competitivas. El filo Halobacteriota tuvo 125 interacciones (40 cooperativas y 85 competitivas) y el filo Firmicutes_A con 93 interacciones (53 cooperativas y 40 competitivas) (Figura 34).

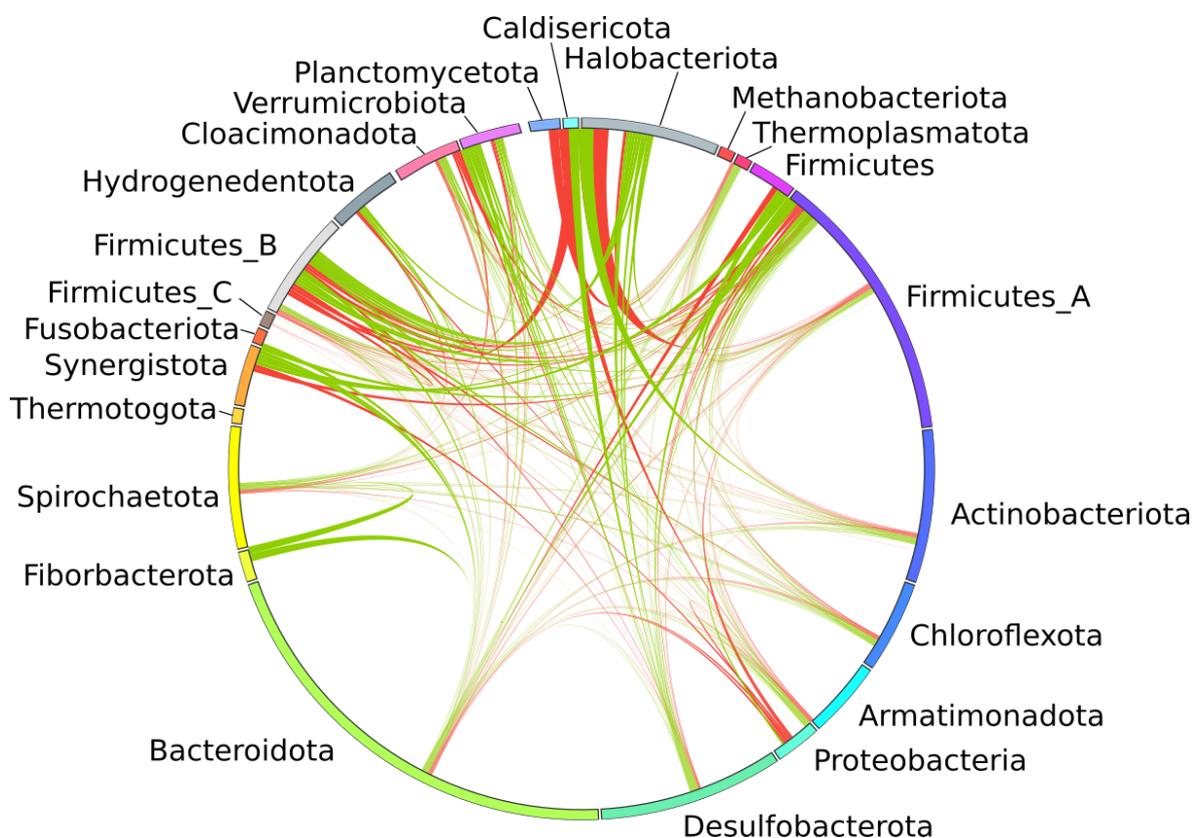


Figura 34: Representación gráfica de interacciones de cooperativismo (enlaces verdes) y competitivas (rojo) a nivel taxonómico de filos. El tamaño de los ideogramas es relativo al número de MAGs que posee cada filo.

Se estudiaron las interacciones competitivas y cooperativas por separado en cada uno de los MAGs (Figura 35 y Figura 36). Entre los organismos con mayor número de interacciones **competitivas**, se encontraron 3 arqueas del filo Halobacteriota. El

MAG del género *Methanoculleus* (AgMethanoculleus_009) correlacionó con 23 MAGs de forma competitiva. Los sustratos más utilizados por *Methanoculleus* fueron el H₂, CO₂, maltosa, acetato y fosfato compitiendo de esta manera con bacterias y arqueas de la comunidad por estos sustratos. Un MAG perteneciente a la familia *Synergistaceae* (BfSynergistaceae_040) compitió con 17 otros organismos por el uso de aminoácidos como L-cysteina, L-malato, L-threonina, L-aspartato, L-histidina y L-arginina. El consumo de algunos de estos aminoácidos (L-malato, L-aspartato y L-treonina), como así también otros compuestos como el fosfato, fumarato, acetaldehído y glicina fueron utilizados por la bacteria perteneciente al filo Firmicutes_B, de la familia *Pelotomaculaceae* (MAG:BfPelotomaculaceae_062) junto con otros 17 diferentes organismos.

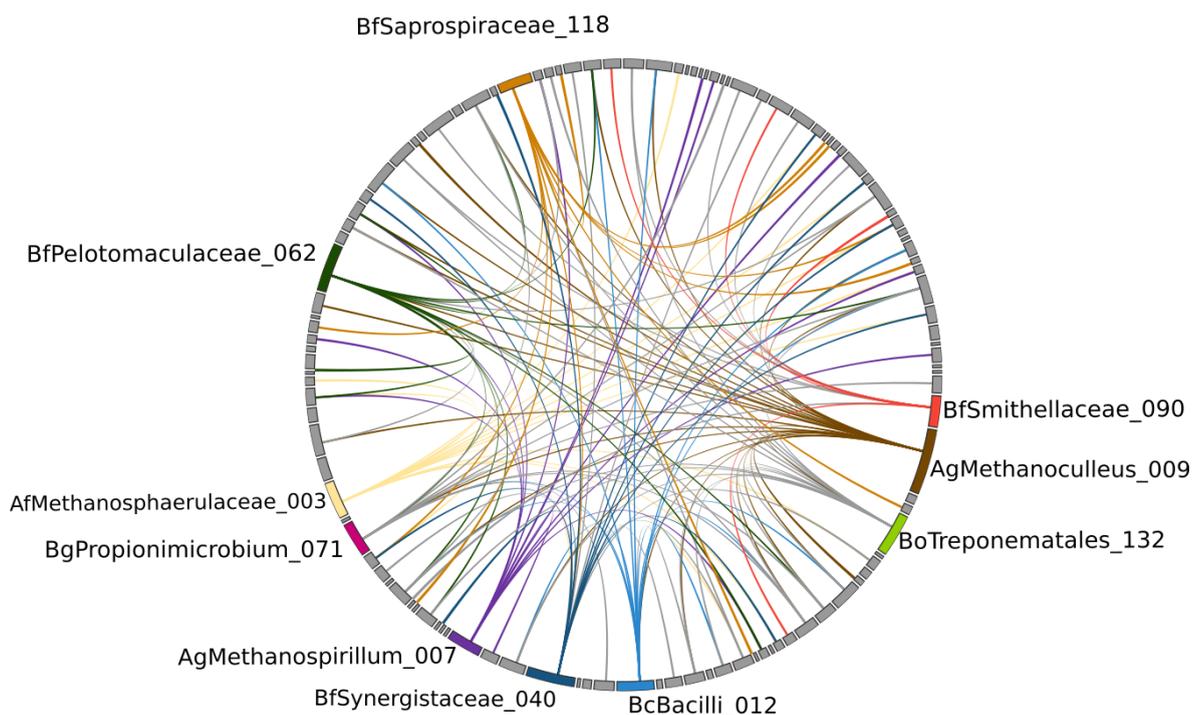


Figura 35: Representación gráfica de interacciones **competitivas** entre los diferentes MAGs. Se asignó un color a los primeros 10 MAGs con mayor número de conexiones competitivas y se representó el mismo color para el enlace. Los MAGs representados en gris no se representaron sus interacciones. El tamaño de los ideogramas está representado por la cantidad de conexiones del MAG.

Los MAGs B_080 y AgMethanospirillum_005 presentaron el mayor número de interacciones **cooperativas** entre los diferentes organismos con un total de 14 cada MAG. El filo Synergistota estuvo representado por una bacteria perteneciente a la familia *Synergistaceae* (MAG:BfSynergistaceae_040) con 9 interacciones cooperativas, y MAGs del género *Aminivibrio* con 13 y 8 interacciones de este tipo (MAG:BgAminivibrio_137, MAG:BgAminivibrio_136). Otra arquea del género *Methanofastidiosum* (MAG:AgMethanofastidiosum_002) estuvo dentro del conjunto de MAGs con mayores interacciones cooperativas con un total de 11. Se comprobó que la producción de H₂ por diversas bacterias sintróficas es consumida principalmente por AgMethanospirillum_005 y AgMethanofastidiosum_002.

El formato, uno de los principales compuestos producidos por el MAG:BgAminivibrio_137, fue consumido por las bacterias BfCloacimonadaceae_122 y BfAnaerolineaceae_020. Otro de los productos del MAG:BgAminivibrio_137 fue el aminoácido L-aspartato, consumido por dos bacterias del orden Bacteroidales (MAG:BoBacteroidales_116 y MAG:BoBacteroidales_034).

Por otra parte, el MAG:BfMicrotrichaceae_072 produjo succinato, el cual fue consumido por 2 bacterias pertenecientes al filo Bacteroidota (MAG:BfSaprospiraceae_118 y MAG:BoBacteroidales_109), 2 bacterias del filo Firmicutes_B (MAG:BfSyntrophomonadaceae_067 y MAG:BfSyntrophomonadaceae_068), una Actinobacteriota (MAG:BgMicrothrix_018) y el MAG B_080.

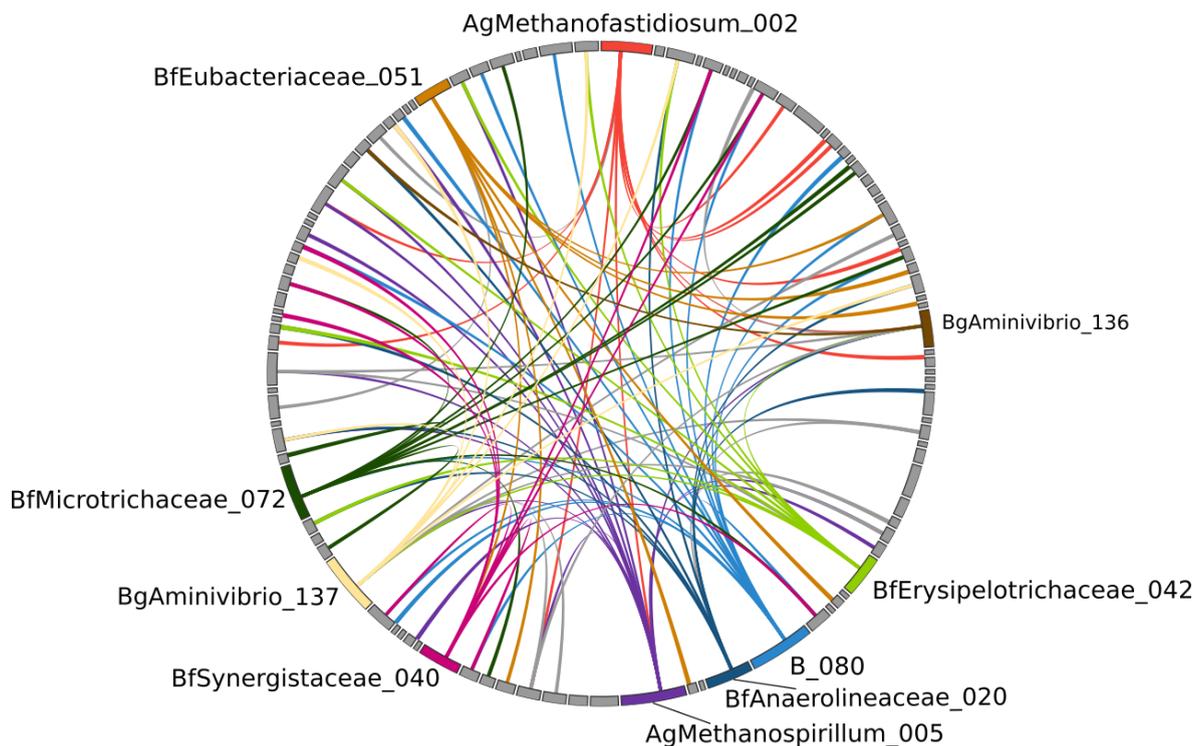


Figura 36: Representación gráfica de interacciones **cooperativas** entre los diferentes MAGs. Se asignó un color a los primeros 10 MAGs con mayor número de conexiones cooperativas y se representó el mismo color para el enlace. Los MAGs representados en gris no se representaron sus interacciones. El tamaño de los ideogramas está representado por la cantidad de conexiones del MAG.

Como era de esperar, la producción de metano fue exclusiva de miembros metanogénicos. Las arqueas del género *Methanothrix* (AgMethanothrix_001 y AgMethanothrix_010) y *Methanoculleus* (AgMethanoculleus_009) fueron las que dominaron la producción de metano a lo largo del experimento (Figura 37).

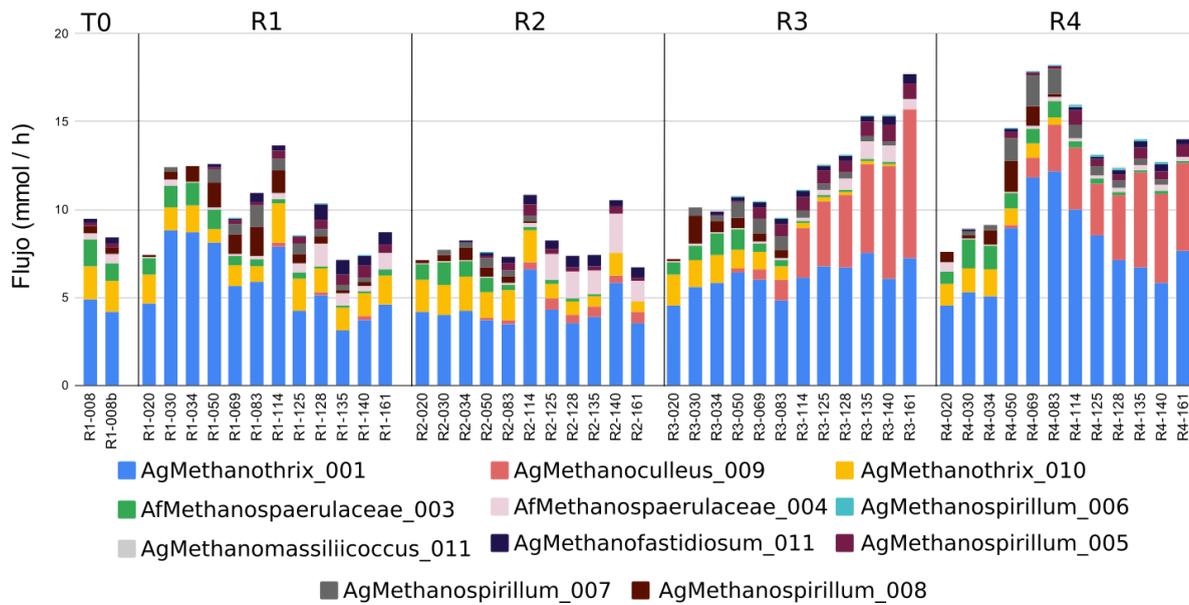


Figura 37: Distribución del flujo de metano producido por las diferentes arqueas metanogénicas.

DISCUSIÓN

Digestión anaeróbica en el marco de una economía circular

El sistema económico lineal se basa en utilizar los recursos para un determinado uso y finalmente disponerlos. Debido a este modelo, se generan mundialmente por año 2,01 mil millones de toneladas de residuos municipales y se estima que para el año 2050 ese número crezca a 3,4 mil millones de toneladas anuales (Paes et al., 2019). La economía circular es una alternativa viable que utiliza los residuos como recurso. En el caso particular de los residuos orgánicos es posible aprovechar su energía. El método de residuo a energía puede contribuir a la creciente demanda energética de diferentes sectores en la sociedad. Una tecnología clave en este contexto es la digestión anaeróbica, ya que es un proceso biotecnológico capaz de generar energía renovable (biogás) a partir de residuos orgánicos (Hussain et al., 2020). La DA implica la transformación de materia orgánica en biogás en un ambiente anóxico por medio de bacterias y arqueas anaeróbicas. El biogás consta principalmente de metano y dióxido de carbono y la proporción de generación de cada gas depende de parámetros operacionales y alimentación de los digestores (Cao y Pawłowski, 2012). El biogás generado puede sustituir otras fuentes de energías no renovables (Nielfa et al., 2015).

La digestión anaeróbica de lodos provenientes de plantas de tratamiento municipales suele tener bajo rendimiento de generación de metano debido a las propiedades recalcitrantes de la pared celular microbiana y los biopolímeros extracelulares. En este trabajo, al igual que en otros estudios, se demostró que el

biogás aumentó junto con el incremento de residuos de alimento (Borowski et al., 2018; Obulisamy et al., 2016; Prabhu y Mutnuri, 2016). Este incremento se debe al ingreso de una mayor proporción de sustrato fácilmente degradable. La entrada de este nuevo sustrato provoca el aumento de la concentración de productos intermediarios de la digestión anaeróbica (Kawai et al., 2014), mejora el balance de nutrientes de la mezcla (Mata-Alvarez et al., 2000), diluye los compuestos inhibitorios en las aguas residuales (Chen et al., 2008) y aumenta la capacidad buffer. Por otro lado, el menor rendimiento específico de metano puede explicarse por la mayor cantidad de carbohidratos en el RA comparado con los lodos mixtos, ya que los carbonos de hidratos tienen un potencial de metano teórico menor en comparación con las proteínas y los lípidos (Møller et al., 2004).

El agregado de un sustrato muy rápidamente biodegradable puede provocar una acumulación de ácidos grasos volátiles, conduciendo de esta manera a una acidificación del digestor (Carballa et al., 2015). En este trabajo se observó un incremento de pH y AGV en las muestras con mayor cantidad de RA. Sin embargo, los valores obtenidos estuvieron dentro de los parámetros normales de un digestor con una buena operación (Van et al., 2020), indicando que los cambios de alimento provocaron un cambio pero no perjudicial para los organismos.

El agregado de residuo alimenticio al digestor anaeróbico selecciona organismos capaces de degradar nuevos sustratos

En digestores anaeróbicos los organismos más abundantes pertenecen a los filos Firmicutes, Bacteroidota, Thermotogae, Proteobacteria y Actinobacteriota dependiendo de la alimentación, temperatura y tiempo de retención hidráulico (Campanaro et al., 2020).

A pesar del renovado interés en la codigestión, pocos estudios han evaluado cómo la co-digestión afecta el microbioma de la digestión anaeróbica, especialmente en un régimen semicontinuo. Estudios anteriores también observaron que las comunidades microbianas se vieron fuertemente alteradas por la carga de RA (Xu et al. 2018, Zhang et al. 2020). Sin embargo, la respuesta de la composición microbiana varió mucho entre los diferentes estudios, dependiendo de las condiciones específicas. Por lo tanto, sigue siendo un desafío determinar cómo se influye en la estabilidad y qué funciones se ven afectadas por los cambios en la composición de la comunidad.

En este trabajo, la reconstrucción de genomas a partir de metagenomas permitió la recuperación de 196 MAGs, de los cuales los filos Bacteroidota (36 MAGs), Firmicutes_A (23 MAGs) y Actinobacteriota (15 MAGs) fueron los mayoritarios. A pesar que Firmicutes suele encontrarse en mayor abundancia en comparación con Bacteroidota (Nielsen et al., 2014; Treu et al., 2016a), este último es un filo dominante en numerosos estudios de digestores anaeróbicos (Campanaro et al., 2020). Sin embargo, hay que destacar que el filo Firmicutes ha sufrido un cambio en la asignación taxonómica y ha sido separado en diferentes filos. En este trabajo se clasificaron MAGs del filo Firmicutes, Firmicutes_A, Firmicutes_B, Firmicutes_C y

Firmicutes_G, dando un total de 36 MAGs. La gran dominancia de estos taxones a lo largo del experimento se debe a que pertenecen a organismos con capacidades distintivas pero principalmente en la degradación de polisacáridos, como en el caso de Bacteroidota, en el cual se detectaron loci de utilización de polisacáridos (PUL por sus siglas en inglés) analizando el metatranscriptoma (Xia et al., 2016).

El cambio en la comunidad microbiana estuvo determinada principalmente por la capacidad hidrolítica de los microorganismos

En el primer paso de la degradación anaeróbica las bacterias hidrolíticas se encargan de degradar los polímeros, permitiendo que los monómeros sean accesibles en la acetogénesis y acidogénesis. Numerosos factores, como la temperatura, el sustrato, el tiempo de retención hidráulico, entre otros, permiten la permanencia de diferentes organismos capaces de degradar polímeros extracelulares y de esta manera que sean accesibles para su uso en el interior celular (Fitamo et al., 2017; Wang et al., 2020). Se analizaron las funciones encargadas de degradar polímeros extracelulares, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos en función a la respuesta del cambio de alimento. Se observó que las enzimas que degradan polisacáridos tienen una respuesta ante el agregado de residuo alimenticio. Dentro de las funciones más abundantes, se encontraron aquellas capaces de degradar sustancias como la celulosa, pectina y hemicelulosa. Este tipo de polímeros son característicos de células vegetales. En este trabajo, una gran proporción del RA era de origen vegetal (68%), por lo que sugerimos que el agregado de este alimento a los reactores anaeróbicos permitió el asentamiento de bacterias con capacidades hidrolíticas a estos nuevos compuestos.

El microbioma anaeróbico contiene una gran variedad de enzimas capaces de degradar carbohidratos complejos (Bertucci et al., 2019). Las enzimas hidrolíticas al estar codificadas en los genomas de diferentes filos bacterianos (Kaoutari et al., 2013), permite a la comunidad microbiana adaptarse a la utilización de nuevos sustratos (De Vrieze et al., 2015)

En el presente trabajo se estudió la presencia de organismos adaptados al cambio de alimentación y con capacidades hidrolíticas distintivas. Uno de los MAGs analizados, MAG.39 del género *Proteiniphilum*, perteneciente a la familia *Porphyromonadaceae* dentro del filo Bacteroidota, tiene una gran variedad de genes capaces de hidrolizar diferentes compuestos, entre ellos Pectina. La pectina es un heteropolisacárido altamente ramificado y por ello un gran número de diversas enzimas logran degradar a este compuesto. Se encuentra en la pared de las células vegetales y es además utilizado en la industria alimenticia. El filo Bacteroidota representa un grupo metabólicamente heterogéneo que juega un papel importante en la digestión anaeróbica de la biomasa vegetal, especialmente para la descomposición primaria de polímeros de cadena larga y la posterior producción de ácidos grasos volátiles (Tomazetto et al., 2018). *Proteiniphilum* se ha aislado de digestores anaeróbicos que tratan aguas residuales de cervecías o ensilado de maíz y paja de trigo (Chen y Dong, 2005; Hahnke et al., 2016). Estudios *in silico* previos han demostrado que *P. saccharofermentans* codifica 64 *loci* de utilización de polisacáridos (del inglés PUL), varios de los cuales están asociados con genes que codifican enzimas extracelulares involucradas en la degradación de carbohidratos complejos (Tomazetto et al., 2018). Varios estudios informaron la presencia de

abundantes organismos de *Proteiniphilum* y sugirieron un papel importante en los reactores productores de biogás, especialmente en codigestores que tratan residuos de alimentos (Koo et al., 2019; Yu et al., 2021). Se identificó en un reactor de tipo lecho expandido granular (EGSB por sus siglas en inglés) a escala de laboratorio que trata lixiviados frescos de residuos sólidos urbanos (RSU) (Dang et al., 2013) y un digestor RSU a gran escala (Cardinali-Rezende et al., 2016). Su predominio en un reactor de fermentación a escala piloto de residuos de alimentos urbanos influyó positivamente en la hidrólisis y en el proceso de acidogénesis (Yu et al., 2021). Otros miembros de la familia *Porphyromonadaceae* estrechamente asociados a *Proteiniphilum* han estado involucrados en la degradación de carbohidratos en reactores de biogás (Ghosh et al., 2020; Granada et al., 2018; Hahnke et al., 2015).

La capacidad hidrolítica no está restringida a un grupo reducido de organismos (Wang et al., 2020). Además del MAG.39, MAGs pertenecientes al filo Bacteroidota y Actinobacteriota que correlacionaron con el aumento de RA a lo largo del experimento tienen la capacidad de hidrolizar diferentes compuestos extracelulares.

Los resultados presentados muestran cómo la comunidad microbiana responde al cambio de alimento manteniendo estable el sistema. Los cambios en la comunidad provocados por la alimentación pueden explicarse por la capacidad metabólica de los microorganismos en el ambiente, seleccionando aquellos que poseen genes capaces de degradar componentes que se encuentran en el nuevo tipo de alimento. De esta manera, la base de la capacidad buffer del sistema recae en la redundancia funcional del microbioma (Langer et al., 2015). Otro concepto diferente es la plasticidad fenotípica, que es la capacidad de la comunidad de adaptarse a los

cambios ambientales ajustando las preferencias metabólicas de los taxones presentes variando su dominancia (Morrissey et al., 2017).

El agregado de residuo alimenticio provee al sistema de un aumento de materia orgánica fácilmente degradable, permitiendo la creación de nuevos nichos ecológicos.

Redes de co-ocurrencia permitieron vislumbrar el cambio de la comunidad asociado al aumento de residuo alimenticio

Las redes de co-ocurrencias de genomas y genes ribosomales a lo largo del experimento mostraron cómo los diferentes organismos respondieron al cambio de alimentación. Se lograron discernir dos módulos principales, uno asociado a bajo y otro a alto contenido de residuo alimenticio. Los organismos presentes en el grupo asociado a mayor RA pertenecen en su mayoría a bacterias hidrolíticas, sugiriendo que el ingreso de polímeros pertenecientes al RA favorecen a los organismos capaces de degradarlos. Al mantener la carga orgánica de lodos mixtos e ir aumentando solamente la fracción de residuos de alimentos, se sugiere que la compartimentalización de las redes observadas sugiere la presencia de redundancia funcional (Poisot et al., 2016).

La conectividad promedio y el coeficiente de agrupamiento promedio de la red se correlacionaron positivamente con la carga de sólidos volátiles y la producción de biogás, lo que sugiere que las estructuras topológicas de la red más complejas se relacionaron con una mayor funcionalidad. Sin embargo, los mismos parámetros de rendimiento mostraron correlaciones negativas con la modularidad de la red. A pesar de ello, no se pudo determinar si la mayor conectividad y la menor

modularidad de las condiciones de alto RA se asociaron a una menor estabilidad como se sugirió en otros trabajos (de Vries et al., 2018) o a una transición incompleta entre comunidades de bajo y alto RA. En el último caso, anticipamos que un mayor tiempo de operación conduciría a un aumento en la modularidad de la red, como se demostró durante la sucesión a largo plazo de la digestión anaeróbica en condiciones de operación estables (Wu et al., 2016).

La producción de metano estuvo gobernada principalmente por una arquea acetoclástica

Analizando la diversidad microbiana relacionada la producción de metano y bacterias sintróficas se observó una dominancia una bacteria sintrófica de *Sphingobacteriales* ST-12K33, la cual se asoció previamente con la digestión anaeróbica de residuos de alimentos (Li et al., 2015), con la codigestión de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos con diferentes co-sustratos (Ziels et al., 2018), así como con digestión anaeróbica con alto contenido de sólidos (Liu et al., 2016). Otra bacteria importante presente en la comunidad pertenece al filo Spirochaetes y sus interacciones con metanógenos en la codigestión anaeróbica de sustratos mixtos se ha destacado en un estudio de la codigestión anaeróbica de glicerina y lodos de depuradora (Razaviarani y Buchanan, 2015). El análisis genómico ha demostrado que el genoma de *Sphaerochaeta* está enriquecido en genes que pueden haber sido adquiridos de Clostridia a través de eventos de transferencia horizontal de genes, lo que permite que la bacteria tenga un estilo de vida fermentativo (Caro-Quintero et al., 2012).

Las especies descritas del filo Fusobacteria pueden producir una variedad de ácidos orgánicos, incluyendo ácido acético, fórmico y butírico a través de la fermentación de carbohidratos, aminoácidos o péptidos (Potrykus et al., 2007). Un papel reconocido de la familia *Synergistaceae* es la degradación sintrófica de ácidos libres volátiles a través de la vía de transferencia entre especies de H₂ (Xu et al., 2016).

Como el cambio de composición de los metanógenos hidrogenotróficos puede estar relacionado con las diferencias energéticas de las reacciones catalizadas por hidrogenasas en la metanogénesis hidrogenotrófica (Thauer et al., 2010), planteamos la hipótesis de que los diversos grupos de hidrogenótrofos adaptados a las distintas condiciones del sustrato podrían tener un papel importante para la operación equilibrada de los digestores anaeróbicos, al proporcionar condiciones termodinámicamente favorables para la fermentación secundaria por diferentes grupos de socios sintróficos, otorgando a *Methanotherx soehngenii* (MAG.187) la posibilidad de dominar la metanogénesis acetoclástica en todo el rango de concentraciones de RA.

El análisis de balance de flujos permitió estudiar las diferentes relaciones tróficas entre los organismos

En grandes comunidades, las comunicaciones inter e intra-especies contribuyen a la diversidad pero además ocasionan una compleja dinámica composicional (Palleja et al., 2018; Shade et al., 2012). Esta comunicación es difícil de vislumbrar y la mayoría de los experimentos se basan en pocas especies y cultivadas *ex situ* en un ambiente controlado. Sin embargo, gracias al uso de modelos metabólicos se pudo predecir diferentes interacciones entre los miembros de la comunidad que era

afectada por el cambio de alimentación. Se pudo estudiar como las arqueas, a pesar de ser un grupo minoritario en la comunidad, afectaron la presencia de otros organismos tanto en forma competitiva como cooperativa. La producción de metano estuvo a cargo principalmente de 3 arqueas, 2 acetoclásticas y una hidrogenotrófica. Los resultados de ABF corroboraron que *Methanotherix soehngeni* fue el organismo acetoclástico principal en la comunidad y se mantuvo activo durante todo el rango de alimentación. Sin embargo, a mayores niveles de RA, la arquea hidrogenotrófica *Methanoculleus* aumento significativamente la producción de metano. Durante la acidogénesis en las muestras con niveles bajos de RA, diferentes arqueas hidrogenotróficas mantuvieron bajo la concentración de H₂, permitiendo así que el acetato fuese el principal producto por las bacterias y sustrato para *Methanotherix*. Sin embargo, a niveles altos de residuo de alimento, hubo acumulación de H₂, de este modo hubo una mayor producción de butirato y propionato. Bacterias sintróficas que oxidan estos compuestos lograron realizarlo gracias a la remoción del H₂ por parte de *Methanoculleus*, que aumentó su producción de metano en estas últimas muestras (Hernández *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

- En este trabajo se realizó el estudio microbiológico de reactores anaeróbicos alimentados con mezclas de lodos mixtos provenientes de una planta municipal de tratamiento de líquidos cloacales y residuos alimenticios. Esto permitió utilizar a los 4 reactores juntos para el ensamblado de los metagenomas.
- Se reconstruyeron con éxito genes de ARNr 16S a partir de datos metagenómicos correspondientes a los miembros dominantes de los biodigestores anaeróbicos. La red de co-ocurrencia indicó un cambio claro en la composición del microbioma que ocurrió con la adición de desperdicio de alimentos como co-sustrato en el proceso de digestión anaeróbica. Un grupo diverso y reproducible de bacterias hidrolíticas y fermentativas, bacterias sintróficas y arqueas metanogénicas parecen crecer de manera concertada para permitir un desempeño estable de la co-digestión anaeróbica a alta FW.
- Mediante la aplicación de enfoques metagenómicos centrados en genes y genomas, se mostró que las enzimas que hidrolizan los polisacáridos extracelulares regían los cambios de la comunidad cuando se añadían residuos de alimentos a los lodos de depuradora para la co-digestión. El cambio en la abundancia de varias bacterias hidrolíticas, en particular *Proteiniphillum*, que tiene la capacidad de degradar varios carbohidratos y proteínas complejos, se correlacionó con el aumento de RA, lo que sugiere que se crearon nuevos nichos microbianos para las bacterias hidrolíticas en respuesta a los cambios en la composición de la materia prima.

- Se logró reconstruir los modelos metabólicos de una fracción representativa de la comunidad microbiana y se evidenciaron relaciones tróficas entre los diferentes miembros a partir del análisis de balance de flujos.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, R., 2005. Scale-free networks in cell biology. *Journal of Cell Science* 118, 4947–4957.
- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Tyson, G.W., Nielsen, P.H., 2013. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes 31.
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F.M., Díez, B., 2016. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology* 9, 149–156.
- Amha, Y.M., Sinha, P., Lagman, J., Gregori, M., Smith, A.L., 2017. Elucidating microbial community adaptation to anaerobic co-digestion of fats, oils, and grease and food waste. *Water Research* 123, 277–289.
- APHA AWWA, W., 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater 20th edition. American Public Health Association, American Water Work Association, Water Environment Federation, Washington, DC.
- Asnicar, F., Thomas, A.M., Beghini, F., Mengoni, C., Manara, S., Manghi, P., Zhu, Q., Bolzan, M., Cumbo, F., May, U., Sanders, J.G., Zolfo, M., Kopylova, E., Pasolli, E., Knight, R., Mirarab, S., Huttenhower, C., Segata, N., 2020. Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. *Nature Communications* 11, 2500.
- Balk, M., Weijma, J., Stams, A.J.M. 2002, 2002. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1361–1368.
- Banks, C.J., Heaven, S., 2013. Optimisation of biogas yields from anaerobic digestion by feedstock type, in: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (Eds.), *The Biogas Handbook*, Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing, pp. 131–165.
- BeMiller, J.N., 1986. An Introduction to Pectins: Structure and Properties 2–12.
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K.M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D.G.J., Nilsson, R.H., 2015. METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources* 15, 1403–1414.
- Bilen, M., Dufour, J.-C., Lagier, J.-C., Cadoret, F., Daoud, Z., Dubourg, G., Raoult, D., 2018. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human

bacterial and archaeal species. *Microbiome* 6, 94.

- Bizukojc, M., Dietz, D., Sun, J., Zeng, A.-P., 2010. Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archaeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions. *Bioprocess and Biosystem Engineering* 33, 507–523.
- Blondel, V.D., Guillaume, J.L., Lambiotte, R., Lefebvre, E., 2008. Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* 2008, 1–12.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30.
- Börjesson, G., Sundh, I., Svensson, B., 2004. Microbial oxidation of CH₄ at different temperatures in landfill cover soils. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 305–312.
- Borowski, S., Boniecki, P., Kubacki, P., Czyżowska, A., 2018. Food waste co-digestion with slaughterhouse waste and sewage sludge: Digestate conditioning and supernatant quality. *Waste Management* 74, 158–167.
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H.M., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O’Toole, P.W., Brugère, J.-F., 2014. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 15, 679.
- Bowers, R.M. et al, 2017. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology* 35, 725–731.
- Brennan, R.B., Healy, M.G., Morrison, L., Hynes, S., Norton, D., Clifford, E., 2016. Management of landfill leachate: The legacy of European Union Directives. *Waste Management* 55, 355–363.
- Caffall, K.H., Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879–1900.
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Luo, G., Angelidaki, I., 2018. Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale biogas plants. *Water Research* 140, 123–134.
- Campanaro, S., Treu, L., Rodriguez-R, L.M., Kovalovszki, A., Ziels, R.M., Maus, I., Zhu, X., Kougias, P.G., Basile, A., Luo, G., Schlüter, A., Konstantinidis, K.T., Angelidaki, I., 2020. New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. *Biotechnology for Biofuels* 13, 1–18.

- Cantalapiedra, C., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., Huerta-Cepas, J., 2021. eggNOG-mapper v2: Functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5825–5829.
- Cao, Y., Pawłowski, A., 2012. Sewage sludge-to-energy approaches based on anaerobic digestion and pyrolysis: Brief overview and energy efficiency assessment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 1657–1665.
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J.M., 2015. Microbial management of anaerobic digestion: Exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 103–111.
- Caro-Quintero, A., Ritalahti, K.M., Cusick, K.D., Löffler, F.E., Konstantinidis, K.T., n.d. The Chimeric Genome of *Sphaerochaeta*: Nonspiral Spirochetes That Break with the Prevalent Dogma in Spirochete Biology. *mBio* 3, e00025-12.
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36, 1925–1927.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99, 4044–4064.
- Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Yue, L., Liu, J., Zhou, J., Cen, K., 2016. Fermentative biohydrogen and biomethane co-production from mixture of food waste and sewage sludge: Effects of physicochemical properties and mix ratios on fermentation performance. *Applied Energy* 184, 1–8.
- Dai, X., Duan, N., Dong, B., Dai, L., 2013. High-solids anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste in comparison with mono digestions: Stability and performance. *Waste Management* 33, 308–316.
- De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D.H., Boon, N., 2016. The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations. *Water Research* 104, 101–110.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C., 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 233–242.
- Diener, C., Gibbons, S.M., Resendis-Antonio, O., Chia, N., 2020. MICOM: Metagenome-Scale Modeling To Infer Metabolic Interactions in the Gut Microbiota. *mSystems* 5, e00606-19.
- D. Shoener, B., M. Bradley, I., D. Cusick, R., S. Guest, J., 2014. Energy positive domestic wastewater treatment: the roles of anaerobic and phototrophic technologies. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16, 1204–1222.

- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., De Cesare, A., 2021. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific Reports* 11, 3030.
- Ebrahim, A., Lerman, J.A., Palsson, B.O., Hyduke, D.R., 2013. COBRApy: COntstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Systems Biology* 7, 74.
- Embree, M., Liu, J.K., Al-Bassam, M.M., Zengler, K., 2015. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 15450–15455.
- Fernando-Foncillas, C., Estevez, M.M., Uellendahl, H., Varrone, C., 2021. Co-Management of Sewage Sludge and Other Organic Wastes: A Scandinavian Case Study. *Energies* 14, 3411.
- Fitamo, T., Treu, L., Boldrin, A., Sartori, C., Angelidaki, I., Scheutz, C., 2017. Microbial population dynamics in urban organic waste anaerobic co-digestion with mixed sludge during a change in feedstock composition and different hydraulic retention times. *Water Research* 118, 261–271.
- Fontana, A., Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Cappa, F., Morelli, L., Angelidaki, I., 2018. Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. *Water Research* 134, 181–191.
- Fournier, G., 2009. Horizontal Gene Transfer and the Evolution of Methanogenic Pathways, in: Gogarten, M.B., Gogarten, J.P., Olendzenski, L.C. (Eds.), *Horizontal gene transfer: Genomes in flux, methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 163–179.
- Ge, H., Jensen, P.D., Batstone, D.J., 2011. Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activated sludge. *Water Research* 45, 1597–1606.
- Gerlach, W., Stoye, J., 2011. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. *Nucleic Acids Research* 39, e91–e91.
- Gilbert, H.J., Knox, J.P., Boraston, A.B., 2013. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current Opinion in Structural Biology, Protein-carbohydrate interactions Biophysical methods* 23, 669–677.
- Gonzalez, A., Vázquez-Baeza, Y., Pettengill, J.B., Ottesen, A., McDonald, D., Knight, R., 2016. Avoiding pandemic fears in the subway and conquering the platypus: TABLE 1. *mSystems* 1, e00050-16.

- Gruber-Vodicka, H.R., Seah, B.K.B., Pruesse, 2020. phyloFlash: Rapid Small-Subunit rRNA Profiling and Targeted Assembly from Metagenomes. *mSystems* 5, e00920-20.
- Guo, X., Wang, C., Sun, F., Zhu, W., Wu, W., 2014. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresource Technology* 152, 420–428.
- Hahnke, S., Langer, T., Koeck, D.E., Klocke, M., 2016. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1466–1475.
- Hall, N., 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology* 210, 1518–1525.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Yashiro, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2008. Detection of Active Butyrate-Degrading Microorganisms in Methanogenic Sludges by RNA-Based Stable Isotope Probing. *Applied Environmental Microbiology* 74, 3610–3614.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., Shoun, H. 2000, 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1601–1609.
- Heirendt, L. et. al., 2019. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0. *Nature Protocols* 14, 639–702.
- Hernández García A, Buitrón Méndez B., Lopez-Vazquez G. M., Cervantes Carrillo F. J., (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño*. IWA publishing.
- Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., Sogin, M.L., 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics* 4, e1000255.
- Huson, D.H., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., Weber, N., Schuster, S.C., 2011. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research* 21, 1552–1560.
- Hussain, Z., Mishra, J., Vanacore, E., 2020. Waste to energy and circular economy: the case of anaerobic digestion. *Journal of Enterprise Information Management* 33, 817–838.

- Ibarbalz, F.M., Pérez, M.V., Figuerola, E.L.M., Erijman, L., 2014. The bias associated with amplicon sequencing does not affect the quantitative assessment of bacterial community dynamics. *PLoS ONE* 9, e99722.
- Jenkins, D., Wanner, J., 2014. *Activated Sludge - 100 Years and Counting*. IWA Publishing. London, UK
- Johnke, J., Cohen, Y., de Leeuw, M., Kushmaro, A., Jurkevitch, E., Chatzinotas, A., 2014. Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 27, 185–190.
- Joseph, T.A., Chlenski, P., Korem, T., Pe'er, I., 2021. Accurate and robust inference of microbial growth dynamics from metagenomic sequencing. *Genome Research* gr.275533.121.
- Jr, C.P.L.G., Daigger, G.T., Love, N.G., Filipe, C.D.M., 2011. *Biological Wastewater Treatment*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kamagata, Y., 2015. Syntrophy in Anaerobic Digestion, in: *Anaerobic Biotechnology*. IMPERIAL COLLEGE PRESS, pp. 13–30.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K., 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal Molecular Biology* 428, 726–731.
- Kaur, G., Luo, L., Chen, G., Wong, J.W.C., 2019. Integrated food waste and sewage treatment – A better approach than conventional food waste-sludge co-digestion for higher energy recovery via anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 289, 121698.
- Kawai, M., Nagao, N., Tajima, N., Niwa, C., Matsuyama, T., Toda, T., 2014. The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield. *Bioresource Technology* 157, 174–180.
- Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., Woerden, F.V., 2018. *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. World Bank Publications.
- Kim, H.-W., Han, S.-K., Shin, H.-S., 2003. The optimisation of food waste addition as a co-substrate in anaerobic digestion of sewage sludge. *Waste Management & Research* 21, 515–526.
- Kim, M., Abdulazeez, M., Haroun, B.M., Nakhla, G., Keleman, M., 2019. Microbial communities in co-digestion of food wastes and wastewater biosolids. *Bioresource Technology* 289, 121580.
- Kontogiorgos, V., 2020. *Pectin: Technological and Physiological Properties*, *Pectin: Technological and Physiological Properties*.

- Kougias PG, Campanaro S, Treu L, Tsapekos P, Armani A, Angelidaki I. 2018. Spatial distribution and diverse metabolic functions of lignocellulose-degrading uncultured bacteria as revealed by genome centric metagenomics. *Applied Environmental Microbiology* 84:1–14.
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.-W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674–1676.
- Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., Peng, X., 2015. Dynamics of microbial community in a mesophilic anaerobic digester treating food waste: Relationship between community structure and process stability. *Bioresource Technology* 189, 113–120.
- Li, Y., Hua, D., Xu, H., Jin, F., Mu, H., Zhao, Y., Fang, X., 2020. Acidogenic and methanogenic properties of corn straw silage: Regulation and microbial analysis of two-phase anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 307, 123180.
- Liu, C., Wang, W., Anwar, N., Ma, Z., Liu, G., Zhang, R., 2017. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of food waste under mesophilic and thermophilic conditions. *Energy Fuels* 31, 2976–2984.
- Liu, Chuanyang, Li, H., Zhang, Y., Liu, Can, 2016. Improve biogas production from low-organic-content sludge through high-solids anaerobic co-digestion with food waste. *Bioresource Technology* 219, 252–260.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42, D490-495.
- Lopes, S.I.C., Sulistyawati, I., Capela, M.I., Lens, P.N.L., 2007. Low pH (6, 5 and 4) sulfate reduction during the acidification of sucrose under thermophilic (55°C) conditions. *Process Biochemistry* 42, 580–591.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74, 3–16.
- McCarty, P.L., Bae, J., Kim, J., 2011. Domestic Wastewater Treatment as a net energy producer. Can This be Achieved? *Environmental Science & Technology* 45, 7100–7106.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., 1981. Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 346–354.

- Mehariya, S., Patel, A.K., Obulisamy, P.K., Punniyakotti, E., Wong, J.W.C., 2018. Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. *Bioresource Technology* 265, 519–531.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., 2008. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386.
- Miller, C.S., Baker, B.J., Thomas, B.C., Singer, S.W., Banfield, J.F., 2011. EMIRGE: reconstruction of full-length ribosomal genes from microbial community short read sequencing data. *Genome Biology* 12, R44.
- Mo, W., Zhang, Q., 2013. Energy–nutrients–water nexus: Integrated resource recovery in municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management* 127, 255–267.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 26, 485–495.
- Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraishi, K., Kamagata, Y., Nakamura, K., Sekiguchi, Y., 2009. Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various Food-Processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes and Environments* 24, 88–96.
- Nguyen, A.Q., Wickham, R., Nguyen, L.N., Phan, H.V., Galway, B., Bustamante, H., Nghiem, L.D., 2018. Impact of anaerobic co-digestion between sewage sludge and carbon-rich organic waste on microbial community resilience. *Environmental Science: Water Research and Technology* 4, 1956–1965.
- Nielfa, A., Cano, R., Fdz-Polanco, M., 2015. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports* 5, 14–21.
- Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., Plichta, D.R., Gautier, L., Pedersen, A.G., Chatelier, E., 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology* 32, 822–828.
- Nissen, J.N., Johansen, J., Allesøe, R.L., Sønderby, C.K., Armenteros, J.J.A., Grønbech, C.H., Jensen, L.J., Nielsen, H.B., Petersen, T.N., Winther, O., Rasmussen, S., 2021. Improved metagenome binning and assembly using deep variational autoencoders. *Nature Biotechnology* 39, 555–560.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., Pevzner, P.A., 2017. metaSPAdes: a new

- versatile metagenomic assembler. *Genome Research* 27, 824–834.
- O'Brien, E.J., Monk, J.M., Palsson, B.O., 2015. Using Genome-scale models to predict biological capabilities. *Cell* 161, 971–987.
- Obulisamy, P.K., Chakraborty, D., Selvam, A., Wong, J.W.C., 2016. Anaerobic co-digestion of food waste and chemically enhanced primary-treated sludge under mesophilic and thermophilic conditions. *Environmental Technology* 37, 3200–3207.
- Olm, M.R., Brown, C.T., Brooks, B., Banfield, J.F., 2017. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME Journal* 11, 2864–2868.
- Orth, J.D., Thiele, I., Palsson, B.O., 2010. What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* 28, 245–248.
- Paes, L.A.B., Bezerra, B.S., Deus, R.M., Jugend, D., Battistelle, R.A.G., 2019. Organic solid waste management in a circular economy perspective – A systematic review and SWOT analysis. *Journal of Cleaner Production* 239, 118086.
- Palleja, A., Mikkelsen, K.H., Forslund, S.K., Kashani, A., Allin, K.H., Nielsen, T., Hansen, T.H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P.T., Coelho, L.P., Yang, H., Wang, Jian, Typas, A., Nielsen, M.F., Nielsen, H.B., Bork, P., Wang, Jun, Vilsbøll, T., Hansen, T., Knop, F.K., Arumugam, M., Pedersen, O., 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature Microbiology* 3, 1255–1265.
- Parks, D.H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B.J., Evans, P.N., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2017. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology* 2, 1533–1542.
- Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresource Technology* 249, 1025–1039.
- Patil, S.M., Kurade, M.B., Basak, B., Saha, S., Jang, M., Kim, S., Jeon, B., 2021. Anaerobic co-digester microbiome during food waste valorization reveals Methanosaeta mediated methanogenesis with improved carbohydrate and lipid metabolism. *Bioresource Technology* 125123.
- Pecorini, I., Peruzzi, E., Albin, E., Doni, S., Macci, C., Masciandaro, G., Iannelli, R., 2020. Evaluation of MSW Compost and Digestate Mixtures for a Circular Economy Application. *Sustainability* 12, 3042.
- Pericard, P., Dufresne, Y., Couderc, L., Blanquart, S., Touzet, H., 2018. MATAM:

reconstruction of phylogenetic marker genes from short sequencing reads in metagenomes. *Bioinformatics* 34, 585–591.

Peterson, D. et. al., 2021. Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. *Frontiers in Microbiology* 12, 1651.

Poirier, S., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *Bioresource Technology* 207, 92–101.

Poisot, T., Stouffer, D.B., Kéfi, S., 2016. Describe, understand and predict: why do we need networks in ecology? *Functional Ecology* 30, 1878–1882.

Potrykus, J., Mahaney, B., White, R.L., Bearne, S.L., 2007. Proteomic investigation of glucose metabolism in the butyrate-producing gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *PROTEOMICS* 7, 1839–1853.

Prabhu, M.S., Mutnuri, S., 2016. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste. *Waste Management and Research* 34, 307–315.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids* 35, 7188–7196

Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation* 12, 247–256.

Randle-Boggis, R.J., Helgason, T., Sapp, M., Ashton, P.D., 2016. Evaluating techniques for metagenome annotation using simulated sequence data. *FEMS Microbiology Ecology* 92, fiw095.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A., 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42, D503-509.

Razaviarani, V., Buchanan, I.D., 2015. Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance. *Bioresource Technology* 182, 8–17.

Rodriguez-R, L.M., Konstantinidis, K.T., 2016. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprints* 4:e1900v1.

Ruiz-Sánchez, J., Campanaro, S., Guivernau, M., Fernández, B., Prenafeta-Boldú,

- F.X., 2018. Effect of ammonia on the active microbiome and metagenome from stable full-scale digesters. *Bioresource Technology* 250, 513–522.
- Scheutz, C., Kjeldsen, P., Bogner, J.E., De Visscher, A., Gebert, J., Hilger, H.A., Huber-Humer, M., Spokas, K., 2009. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Management & Research* 27, 409–455.
- Schnürer, A., Schink, B., Svensson, B.H., 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a Mesophilic Bacterium Oxidizing Acetate in Syntrophic Association with a Hydrogenotrophic Methanogenic Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 1145–1152.
- Shade, A., Read, J.S., Youngblut, N.D., Fierer, N., Knight, R., Kratz, T.K., Lottig, N.R., Roden, E.E., Stanley, E.H., Stombaugh, J., Whitaker, R.J., Wu, C.H., McMahon, K.D., 2012. Lake microbial communities are resilient after a whole-ecosystem disturbance. *ISME Journal* 6, 2153–2167.
- Sikora, A., Detman, A., Chojnacka, A., Błaszczuk, M.K., 2017. Anaerobic Digestion: I. A Common Process Ensuring Energy Flow and the Circulation of Matter in Ecosystems. II. A Tool for the Production of Gaseous Biofuels, in: Jozala, A.F. (Ed.), *Fermentation Processes*. IntechOpen, Rijeka.
- Slatko, B.E., Kieleczawa, J., Ju, J., Gardner, A.F., Hendrickson, C.L., Ausubel, F.M., 2011. “First Generation” Automated DNA Sequencing Technology, in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Speth, D.R., Orphan, V.J., 2018. Metabolic marker gene mining provides insight in global *mcrA* diversity and, coupled with targeted genome reconstruction, sheds further light on metabolic potential of the Methanomassiliicoccales. *PeerJ* 6, e5614.
- Stolyar, S., Van Dien, S., Hillesland, K.L., Pinel, N., Lie, T.J., Leigh, J.A., Stahl, D.A., 2007. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Molecular Systems Biology* 3, 92.
- Svartström, O., Alneberg, J., Terrapon, N., Lombard, V., de Bruijn, I., Malmsten, J., Dalin, A.-M., EL Muller, E., Shah, P., Wilmes, P., Henrissat, B., Aspeborg, H., Andersson, A.F., 2017. Ninety-nine de novo assembled genomes from the moose (*Alces alces*) rumen microbiome provide new insights into microbial plant biomass degradation. *ISME Journal* 11, 2538–2551.
- Tao, X., Zhang, P., Zhang, G., Nabi, M., Wang, S., Ye, J., Bao, S., Zhang, Q., Chen, N., 2019. Carbide slag pretreatment enhances volatile fatty acid production in anaerobic fermentation of four grass biomasses. *Energy Conversion and*

Management 199, 112009.

- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., Shima, S., 2010. Hydrogenases from Methanogenic Archaea, Nickel, a Novel Cofactor, and H₂ Storage. *Annual review of biochemistry* 79, 507–536.
- Thiele, I., Palsson, B.Ø., 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols* 5, 93–121.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* 2, 3.
- Tonanzi, B., Braguglia, C.M., Gallipoli, A., Montecchio, D., Pagliaccia, P., Rossetti, S., Gianico, A., 2020. Anaerobic digestion of mixed urban biowaste: The microbial community shift towards stability, *New Biotechnology* 55, 108–117.
- Tonanzi, B., Gallipoli, A., Gianico, A., Montecchio, D., Pagliaccia, P., Di Carlo, M., Rossetti, S., Braguglia, C.M., 2018. Long-term anaerobic digestion of food waste at semi-pilot scale: Relationship between microbial community structure and process performances. *Biomass and Bioenergy* 118, 55–64.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J., Tringe, S., 2015. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology* 6, 771.
- Treu, L., Campanaro, S., Kougias, P.G., Zhu, X., Angelidaki, I., 2016a. Untangling the Effect of Fatty Acid Addition at Species Level Revealed Different Transcriptional Responses of the Biogas Microbial Community Members. *Environmental Science Technology* 50, 6079–6090.
- Treu, L., Kougias, P.G., Campanaro, S., Bassani, I., Angelidaki, I., 2016b. Deeper insight into the structure of the anaerobic digestion microbial community; The biogas microbiome database is expanded with 157 new genomes. *Bioresource Technology* 216, 260–266.
- Van, D.P., Fujiwara, T., Tho, B.L., Toan, P.P.S., Minh, G.H., 2020. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. *Environmental Engineering Research* 25, 1–17.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., Tyson, G.W., 2016. Genome-centric resolution of microbial diversity, metabolism and interactions in anaerobic digestion. *Environmental Microbiology* 18, 3144–3158.
- Verstraete, W., Boon, N., Van de Wiele, T., Vlaeminck, S.E., 2012. The latest breakthroughs on more fundamental concepts of microbial communities and on their applications in environmental technologies and nutritional/biomedical sciences. *Microbiome Biotechnology* 5, 305–306.

- Westerholm, M., Moestedt, J., Schnürer, A., 2016. Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy* 179, 124–135.
- Westerholm, M., Roos, S., Schnürer, A., 2011. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 260–266.
- Westerholm, M., Roos, S., Schnürer, A., 2010. *Syntrophaceticus schinkiigen* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiology Letters* 309, 100–104.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97–104.
- Wong, D., 2008. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *The Protein Journal* 27, 30–42.
- Worm, P., Koehorst, J.J., Visser, M., Sedano-Núñez, V.T., Schaap, P.J., Plugge, C.M., Sousa, D.Z., Stams, A.J.M., 2014. A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 2004–2016.
- Wu, Y.-W., Tang, Y.-H., Tringe, S.G., Simmons, B.A., Singer, S.W., 2014. MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm. *Microbiome* 2, 26.
- Xia, Y., Wang, Yubo, Wang, Yi, Chin, F.Y.L., Zhang, T., 2016. Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in Anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation. *Biotechnology for Biofuels* 9, 111.
- Xu, H., Wang, C., Yan, K., Wu, J., Zuo, J., Wang, K., 2016. Anaerobic granule-based biofilms formation reduces propionate accumulation under high H₂ partial pressure using conductive carbon felt particles. *Bioresource Technology* 216, 677–683.
- Xu, R., Yang, Z.H., Zheng, Y., Liu, J.B., Xiong, W.P., Zhang, Y.R., Lu, Y., Xue, W.J., Fan, C.Z., 2018. Organic loading rate and hydraulic retention time shape distinct ecological networks of anaerobic digestion related microbiome. *Bioresource Technology* 262, 184–193.
- Xu, R., Yang, Z.H., Zheng, Y., Zhang, H.B., Liu, J.B., Xiong, W.P., Zhang, Y.R., Ahmad, K., 2017. Depth-resolved microbial community analyses in the anaerobic co-digester of dewatered sewage sludge with food waste. *Bioresource Technology* 244, 824–835.
- Yi, J., Dong, B., Jin, J., Dai, X., 2014. Effect of Increasing Total Solids Contents on

- Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLOS ONE* 9, e102548.
- Zamanzadeh, M., Hagen, L.H., Svensson, K., Linjordet, R., Horn, S.J., 2016. Anaerobic digestion of food waste – Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research* 96, 246–254.
- Zampieri, G., Vijayakumar, S., Yaneske, E., Angione, C., 2019. Machine and deep learning meet genome-scale metabolic modeling. *PLOS Computational Biology* 15, e1007084.
- Zhang, B., Zhao, H., Yu, H., Chen, D., Li, X., Wang, W., Piao, R., Cui, Z., 2016. Evaluation of biogas production performance and archaeal microbial dynamics of corn straw during anaerobic co-digestion with cattle manure liquid. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 739–747.
- Zhang, W., Werner, J.J., Agler, M.T., Angenent, L.T., 2014. Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. *Bioresource Technology* 151, 397–401.
- Ziels, R.M., Beck, D.A.C., Martí, M., Gough, H.L., Stensel, H.D., Svensson, B.H., 2015. Monitoring the dynamics of syntrophic β -oxidizing bacteria during anaerobic degradation of oleic acid by quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 91.
- Ziels, R.M., Sousa, D.Z., Stensel, H.D., Beck, D.A.C., 2018. DNA-SIP based genome-centric metagenomics identifies key long-chain fatty acid-degrading populations in anaerobic digesters with different feeding frequencies. *ISME Journal* 12, 112–123.
- Zimmermann, J., Kaleta, C., Waschina, S., 2021. gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models. *Genome Biology* 22, 81.

APÉNDICE

Tabla A1: Clasificación taxonómica, información genómica y relación con las muestras de los MAGs

MAG	Dominio	Filo	Mejor Clasificación	Correlación SV acumulado	Complejidad	Contaminación	Heterogeneidad	ARNt	ARNr
MAG.122	Bacteria	Cloacimonadota	g:Cloacimonas	-0.25	100	2.2	0	45	-
MAG.186	Bacteria	Firmicutes	c:Bacilli	0.69	100	1.33	0	31	0
MAG.76	Bacteria	Firmicutes_A	g:Sedimentibacter	-0.01	99.59	0	0	31	0
MAG.39	Bacteria	Bacteroidota	g:Proteiniphilum	0.70	99.36	0.55	0	42	0
MAG.131	Bacteria	Firmicutes	f:Erysipelotrichaceae	0.78	99.05	2.54	0	37	2
MAG.12	Bacteria	OLB16	-Bacteria	-0.51	98.9	1.75	33.33	51	1
MAG.13	Bacteria	Planctomycetota	o:Sedimentisphaerales	0.14	98.86	1.42	50	46	0
MAG.123	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.32	97.94	0.91	20	39	0
MAG.27	Bacteria	Bacteroidota	f:Saprosiraceae	-0.68	97.52	0.52	0	38	0
MAG.73	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	0.40	97.26	1.2	50	42	0
MAG.56	Bacteria	Desulfobacterota	f:Smithellaceae	-0.69	96.77	3.23	20	43	0
MAG.57	Bacteria	Fusobacteriota	o:Fusobacteriales	0.68	96.63	2.39	0	39	0
MAG.138	Bacteria	Firmicutes_A	f:Acutalibacteraceae	-0.47	96.42	1.01	0	41	0
MAG.133	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.24	96.34	2.42	0	43	0
MAG.89	Archaea	Halobacteriota	f:Methanosphaerulaceae	-0.13	96.16	1.32	100	44	0
MAG.15	Bacteria	Hydrogenedentota	o:Hydrogenedentiales	-0.64	96.15	1.1	0	32	0
MAG.60	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.51	95.97	2.51	0	41	1
MAG.136	Bacteria	Firmicutes_A	s:Pseudoruminococcus massiliensis	0.08	95.64	1.68	66.67	36	0
MAG.109	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.37	95.43	0.51	60	33	0
MAG.71	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	0.58	95.43	0.54	0	43	2
MAG.98	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.12	95.16	1.2	100	34	1
MAG.25	Bacteria	Actinobacteriota	s:Microthrix parvicella	-0.35	94.68	0.85	0	53	1
MAG.158	Bacteria	Cloacimonadota	g:Syntrophosphaera	-0.48	94.51	3.85	50	40	0
MAG.148	Bacteria	Spirochaetota	g:Rectinema	0.51	94.45	0.19	100	36	1
MAG.86	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.26	94.35	1.48	0	26	0
MAG.107	Bacteria	Armatimonadota	f:Fimbrimonadaceae	-0.56	94.29	2.78	33.33	48	1
MAG.50	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	0.78	94.29	1.19	0	38	0
MAG.70	Bacteria	Desulfobacterota	g:Smithella	-0.64	94.19	5.16	25	43	0
MAG.23	Bacteria	Bacteroidota	f:Prolixibacteraceae	-0.49	93.98	1.88	25	40	0
MAG.51	Bacteria	Actinobacteriota	O:Acidimicrobiales	-0.59	93.85	1.28	50	41	0
MAG.58	Bacteria	Bacteroidota	f:Paludibacteraceae	-0.60	93.82	2.15	25	41	1

MAG.120	Archaea	Halobacteriota	g:Methanospirillum	-0.48	93.77	3.49	85.71	39	0
MAG.114	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	-0.21	93.72	4.46	33.33	36	0
MAG.30	Bacteria	Bacteroidota	f:Prolixibacteraceae	0.04	93.68	0.99	33.33	42	0
MAG.53	Bacteria	Desulfobacterota	o:Syntrophales	-0.22	93.55	3.23	0	47	1
MAG.34	Bacteria	Armatimonadota	p:Armatimonadota	-0.42	93.52	0.93	100	44	0
MAG.67	Bacteria	Actinobacteriota	o:Solirubrobacterales	-0.71	93.1	1.29	50	42	0
MAG.145	Bacteria	Bacteroidota	f:Paludibacteraceae	-0.31	93.01	1.08	0	41	1
MAG.47	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Kiritimatiellae	0.48	92.74	3.41	0	47	0
MAG.29	Bacteria	Actinobacteriota	g:Microthrix	-0.43	92.71	1.71	50	53	1
MAG.26	Bacteria	Armatimonadota	p:Armatimonadota	-0.30	92.59	2.31	20	49	1
MAG.8_A	Bacteria	Actinobacteriota	g:Gordonia	-0.59	92.43	2.28	54.55	59	0
MAG.63	Bacteria	Hydrogenedentota	o:Hydrogenedentiales	0.60	92.1	2.25	33.33	26	0
MAG.164	Archaea	Methanobacteriota	g:Methanofastidiosum	-0.18	91.97	1.98	0	45	1
MAG.171	Bacteria	Firmicutes	c:Bacilli	0.63	91.89	0.27	0	32	1
MAG.66	Bacteria	Firmicutes_A	f:Ruminococcaceae	-0.22	91.59	2.91	14.29	30	0
MAG.134	Bacteria	Firmicutes_A	f:Anaerovoracaceae	0.13	91.49	1.3	33.33	25	0
MAG.108	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	0.75	91.36	5.81	82.35	44	0
MAG.62	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.28	90.92	1.08	0	35	0
MAG.52	Bacteria	Armatimonadota	p:Armatimonadota	-0.11	90.74	2.73	37.5	45	0
MAG.104	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.19	90.63	3.12	66.67	37	0
MAG.90	Bacteria	Thermotogota	f:Petrogaceae	0.29	90.52	5.34	50	36	1
MAG.35	Bacteria	Actinobacteriota	f:Microtrichaceae	-0.59	90.46	0.85	0	49	0
MAG.88	Bacteria	Acidobacteriota	g:Holophaga	-0.18	90.37	1.75	50	43	0
MAG.77	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	-0.64	90	5.82	11.11	42	0
MAG.87	Bacteria	Fibrobacterota	f:Fibrobacteraceae	0.06	89.85	3.62	0	40	0
MAG.113	Bacteria	Bacteroidota	g:Proteiniphilum	0.08	89.82	1.28	66.67	28	0
MAG.8_B	Bacteria	Actinobacteriota	g:Gordonia	-0.37	89.42	0.28	100	48	0
MAG.144	Bacteria	Cloacimonadota	g:Cloacimonas	-0.49	89.38	2.81	0	42	0
MAG.135	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	0.08	89.15	1.71	50	34	0
MAG.152	Bacteria	Firmicutes_A	g:Massilimoniales	0.58	88.88	1.34	50	22	0
MAG.19	Bacteria	Armatimonadota	p:Armatimonadota	-0.60	88.43	3.24	100	39	0
MAG.118	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	-0.50	88.18	3.67	42.86	44	0
MAG.40	Bacteria	Spirochaetota	p:Spirochaetota	-0.61	88.05	2.25	0	37	0
MAG.92	Bacteria	Desulfobacterota	f:Syntrophorhabdaceae	-0.34	87.7	3.12	0	32	0
MAG.22	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Kiritimatiellae	0.42	87.5	3.83	9.09	44	0
MAG.65	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	-0.45	87.27	2.91	0	50	0
MAG.7	Bacteria	Bacteroidota	f:Saprosiraceae	-0.42	87	2.72	14.29	33	0
MAG.42_B	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	0.29	86.96	0.59	0	36	0
MAG.117	Bacteria	Desulfobacterota	o:Syntrophales	0.12	86.68	5.39	13.64	37	0
MAG.78	Bacteria	Spirochaetota	f:Treponemataceae	-0.56	86.47	0.98	66.67	33	0
MAG.141	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.51	86.43	5.56	64.29	29	0
MAG.69	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.69	86.03	1.95	44.44	29	0
MAG.116	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	0.39	85.95	2.28	50	25	0
MAG.153	Archaea	Halobacteriota	g:Methanospirillum	0.73	85.84	0.65	0	37	0

MAG.102	Bacteria	Firmicutes A	f:Tissierellaceae	0.19	85.82	3.5	16.67	33	0
MAG.110	Bacteria	Firmicutes A	o:Christensenellales	-0.17	85.39	3.83	57.14	25	0
MAG.94	Bacteria	Riflobacterota	f:Ozomobacteraceae	0.05	85.33	1.33	0	36	1
MAG.83	Bacteria	Desulfobacterota	o:Syntrophales	-0.53	85.16	3.23	20	34	0
MAG.149	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.21	85.13	3.41	33.33	29	0
MAG.95	Bacteria	Spirochaetota	f:Treponemataceae	0.19	85.13	1.85	12.5	26	0
MAG.111	Bacteria	Firmicutes A	o:Christensenellales	0.66	85.08	2.82	0	44	1
MAG.68	Bacteria	Proteobacteria	f:Neiellaceae	0.22	84.87	2.3	66.67	45	0
MAG.91	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.23	84.84	1.19	0	21	0
MAG.33	Bacteria	Fibrobacterota	f:Chitinispirillaceae	-0.74	84.55	2.2	0	26	0
MAG.115	Bacteria	Actinobacteriota	s:Actinomyces oricola	0.32	84.42	3.91	18.18	35	0
MAG.176	Archaea	Halobacteriota	f:Methanoregulaceae	-0.68	84.32	0.84	0	31	0
MAG.147	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	0.50	84.09	3.84	50	37	0
MAG.80	Bacteria	Desulfobacterota	f:Smithellaceae	-0.09	83.87	2.28	60	32	0
MAG.16	Bacteria	Cyanobacteria	f:Obscuribacteraceae	-0.61	83.48	3.49	62.5	31	0
MAG.132	Bacteria	Cloacimonadota	f:Cloacimonadaceae	0.23	83.4	3.66	22.22	16	0
MAG.159	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.15	82.86	1.98	14.29	26	0
MAG.130	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	-0.27	82.7	2.73	33.33	32	0
MAG.169	Bacteria	Caldisericota	c:Caldisericia	0.67	82.55	5.36	0	46	0
MAG.100	Bacteria	Synergistota	g:Aminivibrio	0.80	82.43	3.39	50	21	1
MAG.121	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.35	82.03	6.43	41.18	21	0
MAG.84	Bacteria	Actinobacteriota	g:Ancrocorticia	0.84	81.93	1.34	0	28	1
MAG.139	Bacteria	Proteobacteria	o:Enterobacteriales	0.13	81.51	2.05	20	29	0
MAG.203	Bacteria	Synergistota	f:Synergistaceae	-0.41	81.36	0.15	0	14	0
MAG.99	Bacteria	Armatimonadota	p:Armatimonadota	-0.24	80.83	2.78	66.67	39	0
MAG.44	Bacteria	Myxococcota	p:Myxococcota	-0.49	80.68	3.06	57.14	43	0
MAG.146	Bacteria	Firmicutes B	f:Pelotomaculaceae	0.82	80.23	0	0	28	0
MAG.140	Bacteria	Cloacimonadota	o:Cloacimonadales	-0.09	80.22	2.48	0	23	0
MAG.240	Bacteria	Patescibacteria	c:Paceibacteria	0.58	80.15	2.74	100	40	0
MAG.126	Bacteria	Bacteroidota	f:Paludibacteraceae	0.41	78.98	1.92	57.14	25	0
MAG.106	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	0.70	78.81	3.64	50	35	0
MAG.249	Bacteria	Patescibacteria	c:Paceibacteria	-0.25	78.74	0	0	43	1
MAG.45	Bacteria	Bacteroidota	f:Saprosiraceae	-0.66	78.4	2.57	50	26	1
MAG.79	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Kiritimatiellae	0.64	78.4	3.41	0	27	0
MAG.72	Bacteria	Bacteroidota	g:Lentimicrobium	0.86	78.3	3.58	0	16	0
MAG.143_A	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	-0.40	78.24	0.78	0	27	0
MAG.232	Bacteria	Patescibacteria	c:Dojkabacteria	0.11	78.13	0.86	0	41	1
MAG.163	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	-0.31	77.56	3.06	75	27	0
MAG.168	Bacteria	Spirochaetota	g:Rectinema	-0.19	77.31	0.21	50	37	0
MAG.93	Bacteria	Desulfobacterota	f:Smithellaceae	0.56	77.15	3.79	46.15	24	0
MAG.177	Bacteria	Spirochaetota	g:Sphaerochaeta	0.53	77.06	2.27	50	22	0
MAG.127	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	0.57	76.65	2.76	42.86	27	0

MAG.156	Bacteria	Firmicutes A	f:Eubacteriaceae	-0.40	76.55	1.08	0	12	0
MAG.195	Bacteria	Patescibacteria	c:Dojkabacteria	0.48	76.41	3.84	0	51	0
MAG.59	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.30	76.2	2.2	20	27	0
MAG.49	Bacteria	Synergistota	g:Aminivibrio	0.94	76.19	0.62	0	14	0
MAG.37	Bacteria	Proteobacteria	o:Pseudomonadales	-0.61	76	1.23	36.36	23	0
MAG.103	Bacteria	Synergistota	f:Aminiphilaceae	0.44	75.96	1.85	100	29	0
MAG.18	Bacteria	Hydrogenedentota	o:Hydrogenedentiales	-0.23	75.61	2.46	16.67	40	0
MAG.179	Bacteria	Firmicutes C	f:Acidaminococcaceae	0.85	74.51	2.44	75	43	0
MAG.191	Archaea	Thermoplasmatota	f:Methanomethylophilaceae	0.76	74.43	2.48	50	28	0
MAG.61	Bacteria	Firmicutes A	o:Acetivibrionales	-0.16	74.36	2.59	37.5	33	0
MAG.24	Bacteria	Desulfobacterota	o:Syntrophales	0.03	74.19	1.86	20	24	0
MAG.162	Bacteria	Cloacimonadota	o:Cloacimonadales	-0.30	73.74	3.59	0	35	0
MAG.321	Archaea	Halobacteriota	g:Methanospirillum	0.74	73.2	0.65	0	30	0
MAG.165	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	0.17	72.84	1.43	33.33	25	0
MAG.101	Bacteria	Desulfobacterota	f:Smithellaceae	-0.11	72.67	3.36	62.5	15	0
MAG.55	Bacteria	Chloroflexota	c:Anaerolineae	0.34	72.63	1.83	0	29	0
MAG.227	Bacteria	Patescibacteria	c:Microgenomatia	-0.50	72.26	0	0	37	1
MAG.151	Bacteria	Spirochaetota	g:Sphaerochaeta	0.80	71.91	2.65	0	19	0
MAG.154	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.78	71.67	2.24	0	18	1
MAG.64	Bacteria	Bacteroidota	f:Marinilabiliaceae	0.58	71.27	4.42	71.43	24	0
MAG.105	Bacteria	Proteobacteria	g:Ottowia	-0.81	71.09	1.66	20	33	0
MAG.119	Bacteria	Bacteroidota	f:Melioribacteraceae	-0.22	71.07	3.35	50	22	0
MAG.96	Bacteria	Desulfuromonadota	f:Geobacteraceae	0.15	70.18	1.75	0	31	0
MAG.157	Bacteria	Actinobacteriota	f:Actinomycetaceae	0.36	68.28	1.75	0	22	0
MAG.46	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Lentisphaeria	0.60	68.27	1.61	28.57	14	0
MAG.75	Bacteria	Desulfobacterota	f:Smithellaceae	-0.46	68.18	1.29	0	20	0
MAG.74	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Lentisphaeria	-0.56	68.02	4.6	44.44	34	0
MAG.155	Bacteria	Planctomycetota	f:Anaerohalophaeraceae	0.43	67.98	2.27	0	31	0
MAG.48	Bacteria	Verrucomicrobiota	f:Puniceicoccaceae	0.65	67.69	4.77	80	29	0
MAG.180	Bacteria	Firmicutes A	c:Clostridia	-0.02	66.69	1.81	40	20	0
MAG.142	Archaea	Halobacteriota	f:Methanosphaerulaceae	-0.31	64.8	2.02	80	29	0
MAG.20	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.24	64.66	57.76	97.56	43	0
MAG.85	Bacteria	Spirochaetota	g:Sphaerochaeta	0.55	64.32	0	0	6	0
MAG.43	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Kiritimatiellae	-0.55	63.83	0.68	100	31	0
MAG.204	Bacteria	Patescibacteria	o:Saccharimonadales	-0.42	63.34	5.14	11.11	38	0
MAG.223	Bacteria	Patescibacteria	c:ABY1	0.47	63.26	2.48	0	44	1
MAG.128	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.31	63.09	3.42	25	29	0
MAG.11 B	Bacteria	Proteobacteria	g:Dokdonella	-0.56	62.94	0.16	33.33	27	0
MAG.97	Archaea	Halobacteriota	s:Methanosarcina vacuolata	-0.23	62.5	1.9	37.5	24	0
MAG.167	Bacteria	Cloacimonadota	g:Cloacimonetes-2	-0.31	62.11	3.85	0	23	0

MAG.181	Archaea	Halobacteriota	f:Methanosphaerulaceae	0.04	61.69	2.63	75	23	0
MAG.1	Bacteria	Proteobacteria	g:Azonexus	-0.38	61.44	0.71	0	18	0
MAG.124	Bacteria	Bacteroidota	o:Kapabacteriales	0.03	61.18	1.09	50	30	0
MAG.2_B	Bacteria	Actinobacteriota	f:Dermatophilaceae	-0.49	60.82	0.54	0	27	0
MAG.9_A	Bacteria	Hydrogenedentota	o:Hydrogenedentiales	-0.49	60.75	0	0	17	1
MAG.6	Bacteria	Proteobacteria	f:Burkholderiaceae	-0.76	60.5	4.31	22.22	26	0
MAG.187	Archaea	Halobacteriota	s:Methanoxithrix soehngenii	0.80	60.35	1.31	50	15	0
MAG.38	Bacteria	Eremiobacterota	s:Xenobium purgamenti	0.40	60.31	0.86	0	24	0
MAG.226	Bacteria	Patescibacteria	o:Saccharimonadales	-0.39	60.03	4.48	16.67	32	0
MAG.173	Bacteria	Firmicutes_A	o:Saccharofermentales	-0.68	59.35	0.41	0	13	0
MAG.42_A	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.39	57.34	1.61	50	21	0
MAG.199	Bacteria	Cloacimonadota	g:Syntrophosphaera	-0.45	56.83	0	0	12	0
MAG.150	Bacteria	Actinobacteriota	g:Brooklawnia	-0.79	56.78	5.3	0	16	0
MAG.190	Bacteria	Chloroflexota	f:Anaerolineaceae	0.20	56.71	4.71	57.89	14	0
MAG.182	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	-0.23	56.57	1.6	11.11	8	0
MAG.21_B	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Kiritimatiellae	-0.07	56.27	0.9	66.67	27	0
MAG.166	Bacteria	Firmicutes_B	f:Syntrophomonadaceae	-0.22	56.17	3.28	44.44	15	0
MAG.185	Bacteria	Firmicutes_A	o:Christensenellales	-0.32	56.03	0.81	0	21	0
MAG.271	Bacteria	Patescibacteria	o:Paceibacterales	0.66	56.03	0.99	100	29	1
MAG.17_A	Bacteria	Bacteroidota	c:Bacteroidia	-0.67	55.17	0	0	19	0
MAG.192	Bacteria	Caldisericota	c:Caldisericia	-0.53	54.87	0	0	27	0
MAG.201	Bacteria	Patescibacteria	c:Dojkabacteria	-0.29	54.86	5.26	0	46	0
MAG.31_A	Bacteria	Firmicutes_G	c:SHA-98	0.29	54.32	1.13	0	13	0
MAG.82	Bacteria	Myxococcota	p:Myxococcota	0.75	54.07	4.19	7.69	26	0
MAG.137	Bacteria	Bacteroidota	o:Bacteroidales	-0.23	53.36	3.49	0	14	0
MAG.32_A	Archaea	Halobacteriota	g:Methanospirillum	0.24	52.53	0	0	14	0
MAG.14	Bacteria	Chloroflexota	g:Promineofilum	-0.36	52.27	0.91	0	18	0
MAG.129	Bacteria	Actinobacteriota	f:Ilumatobacteraceae	-0.55	51.58	1.36	33.33	23	0
MAG.196	Archaea	Thermoplasmata	g:Methanomassiliicoccus	0.09	51.29	2.42	0	17	0
MAG.172	Archaea	Halobacteriota	g:Methanoculleus	0.89	50.74	2.06	60	14	0
MAG.112_C	Bacteria	Bacteroidota	f:Paludibacteraceae	-0.36	50.7	1.4	66.67	16	0
MAG.188	Bacteria	Actinobacteriota	f:Solirubrobacteraceae	-0.70	50.68	5.27	50	32	0
MAG.189	Bacteria	UBP6	p:UBP6	0.64	50.54	2.78	20	8	0
MAG.10_B	Bacteria	Verrucomicrobiota	c:Lentisphaeria	-0.79	50.44	0.71	0	14	0
MAG.175	Bacteria	Firmicutes_A	g:Herbinix	0.69	50.39	0.86	0	23	0
MAG.178	Bacteria	Actinobacteriota	g:Brevilactibacter	0.86	49.99	1.13	28.57	29	0
MAG.160	Bacteria	Bacteroidota	g:Petrimonas	0.75	46.47	0	0	18	0
MAG.198	Bacteria	Synergistota	f:Synergistaceae	-0.39	46.16	0	0	8	0
MAG.31_B	Bacteria	Firmicutes_G	c:SHA-98	0.26	45.64	1.92	66.67	7	0

