

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología



Tesis para optar al grado de Magister Scientiarum en Biología

**Efecto del gradiente de nutrientes en un humedal artificial
de *Schoenoplectus californicus* sobre las bacterias
involucradas en el ciclo del azufre y el nitrógeno**

Postulante: Lic. Pablo Cannestraci Lemaitre

Tutor: Dr. Darío Achá Cordero

Tribunales: Dra. Isabel Morales Belpaire

Dr. Sergio Gutiérrez Cortez

Noviembre, 2023

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE BIOLOGIA – INSTITUTO DE ECOLOGIA
MAESTRIA TERMINAL EN BIOLOGIA

“Efecto del gradiente de nutrientes en un humedal artificial de *Schoenoplectus californicus*
sobre las bacterias involucradas en el ciclo del azufre y el nitrógeno”

Tesis presentada para optar por el grado de Magister Scientiarum en Biología

Tutor

Dr. Darío Achá Cordero

Tribunales

Dra. Isabel Morales Belpaire

Dr. Sergio Gutiérrez Cortez

Director de Carrera

M. Sc. Winder Canezo Gomez

Dedicatoria

Mi más profunda gratitud a mi tutor el Dr. Darío Achá Cordero por sus enseñanzas a lo largo de los años desde que inicie mi tesis de licenciatura hasta el día de hoy.

Agradecimiento a mis tribunales Dra. Isabel Morales y Dr. Sergio Gutiérrez, cuyos comentarios, y correcciones fortalecieron y mejoraron la calidad del trabajo expuesto en esta tesis.

Agradecimientos a la Carrera de Biología y a todos sus docentes por las enseñanzas impartidas todos estos años.

A toda mi familia y especialmente mis padres, Eduardo Cannestraci y Cecilia Lemaitre por todo su apoyo incondicional en mi desarrollo profesional.

Agradecimiento profundo a mis colegas del proyecto BIOREM y mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Calidad Ambiental, especialmente Noelia Rendon y Roxana Quiroga, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

INDICE

1. Introducción.....	2
2. Materiales & Métodos.....	3
2.1. Construcción del Sistema de Mesocosmos.....	3
2.2. Medición de concentración de nutrientes y parámetros fisicoquímicos.....	5
2.3. Muestreo de Sedimento y Perifiton.....	6
2.4. Extracción de ADN.....	6
2.5. Secuenciación MinION y Análisis Bioinformático.....	7
2.6. Análisis estadístico.....	8
2.6.1. Efecto de la concentración de nutrientes en la comunidad bacteriana.....	8
2.6.2. Efecto de las abundancias de bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno en la recuperación de nitrato.....	8
3. Resultados.....	9
3.1. Resultados generales de parámetros fisicoquímicos y diversidad alfa.....	9
3.2. Efecto de la concentración de nutrientes en la CBAN.....	11
3.3. Efecto de la abundancia relativa de bacterias del nitrógeno en la concentración de nitratos...13	
4. Discusión.....	14
4.1. Generalidades.....	14
4.2. Efecto de la concentración de nutrientes en la CBAN en Sedimentos y Perifiton.....	16
4.3. Relación entre nutrientes disueltos en la columna de agua y abundancia relativa de géneros bacterianos de la CBAN en sedimentos.....	16
4.4. Recuperación de nitrato en mesocosmos de <i>S. californicus</i>	19
5. Conclusión.....	20
6. Agradecimientos.....	21
7. Referencias.....	22
8. Anexos.....	28

Resumen

Schoenoplectus californicus (Tatora) es una macrófita utilizada en fitorremediación y constituye una alternativa viable para reducir el impacto de la presión antropogénica sobre los cuerpos de agua. Sin embargo, existe poca información sobre la comunidad bacteriana asociada a *S. californicus* en el proceso de fitorremediación. Para estudiar esto, construimos un sistema artificial de mesocosmos conectados secuencialmente. Se añadieron nutrientes al sistema para emular aguas residuales con tratamiento primario parcial, y se midieron las concentraciones de nitritos, nitratos, fosfatos y sulfuros en la columna de agua de todos los mesocosmos. Se colectaron muestras de perifiton y sedimentos en tres fechas para extraer ADN bacteriano genómico. La composición de la comunidad bacteriana en ambos tipos de muestras se obtuvo mediante secuenciación MinION 16S rADN. Las comunidades bacterianas tanto en muestras de sedimento como de perifiton estaban compuestas predominantemente por Proteobacterias (70% y 86%, respectivamente), siendo las muestras de sedimento en general más diversas y albergando un mayor número de especies que las muestras de perifiton. A través de un análisis canónico de correspondencias (CCA) detectó un efecto significativo de la concentración de fosfato y nitrito en la abundancia relativa de géneros bacterianos asociados a los ciclos biogeoquímicos del azufre y el nitrógeno. No se detectó tal efecto en las muestras de perifiton. Las altas concentraciones de nitrito y fosfato promovieron una mayor abundancia relativa de bacterias oxidadores de azufre (*Beggiatoa*, *Sulfitobacter*, *Thiomonas*), reductoras de sulfato (*Desulfarculus*, *Desulfobacca*, *Desulfobacula*), reductoras de nitrato (*Methylibium*, *Methylococcus*, *Methyloprofundus*, *Chromobacterium*), y metabolizadores de metales (*Sphaerotilus*, *Sideroxydans*, *Ferribacterium*) en muestras de sedimento. La proliferación de estos grupos en respuesta a las concentraciones de nutrientes medidas sugiere la implicación de dichos grupos en el proceso de fitorremediación en los humedales artificiales de *S. californicus* y podría tener importantes implicaciones en la salud del ecosistema dependiendo del efecto de estos grupos bacterianos en la transformación y/o degradación de especies de metales, azufre y nitrógeno.

Palabras claves: Fitorremediación, comunidad bacteriana, 16S rADN, gradiente de nutrientes, ciclos biogeoquímicos

1. Introducción

La salud y la sostenibilidad de los cuerpos de agua en todo el mundo se ven amenazadas por varias presiones medioambientales de origen antropogénico. Ejemplos de estas presiones son: la contaminación por metales pesados y xenobióticos (López-Pacheco et al., 2019), descargas de aguas residuales, y eutrofización (Khan & Mohammad, 2014). Eliminar o reducir el impacto de estas fuentes de contaminación es importante para salvaguardar la salud de los ecosistemas, y la sostenibilidad de los recursos hídricos y biológicos de los que dependen las comunidades humanas circundantes. Una posible solución para resolver parcialmente estos problemas es la fitorremediación (Chen et al., 2016; Ijaz et al., 2016).

Schoenoplectus californicus (Tatora) es una planta acuática que ha sido utilizada en trabajos de fitorremediación (Vymazal, 2013), los cuales incluyen: remoción de metales pesados de aguas contaminadas (Blanco, 2019; Sarret et al., 2019), remoción de nitrógeno y fósforo de cuerpos de agua (López et al., 2016), y remoción de pesticidas organoclorados a través de acumulación en sus tejidos (Miglioranza et al., 2004). Otras especies del género *Schoenoplectus* también han sido utilizadas en fitorremediación, como *S. americanus* en la remoción de zinc de suelos contaminados (Arreghini et al., 2006) y *S. lacustris* en la acumulación de metales pesados en suelos contaminados (Duman et al., 2007).

A pesar de su nombre, la fitorremediación no sólo la llevan a cabo las plantas, ya que toda la comunidad asociada a ellas participa en estos procesos. La presencia de plantas introduce cambios ambientales como mayores concentraciones de oxígeno y materia orgánica en el medio circundante (Rehman et al., 2019). Las plantas utilizadas en estudios de fitorremediación alteran la composición y abundancia de las comunidades microbianas del medio circundante, y de hecho, dependen de este fenómeno para el éxito de la fitorremediación (Ma et al., 2018; Rehman et al., 2019; Shahid et al., 2018). A medida que las plantas remueven nutrientes y otros compuestos químicos del medio, esto puede influir en la composición y actividad de la comunidad bacteriana circundante. Los cambios en la comunidad bacteriana pueden repercutir a su vez en el ciclo de nutrientes (Yan et al., 2015), otros ciclos biogeoquímicos (Schlesinger & Bernhardt, 2020) y carga de patógenos (Cabral, 2010). En el caso de la tatora, se ha visto en otros estudios que el perifiton que crece adherido a esta macrófita puede acumular metilmercurio (Quiroga-Flores et al., 2021) y arsénico (Sarret et al., 2019). Por su parte, los sedimentos poblados por plantas contienen microorganismos que tienen el potencial de contribuir a la fitorremediación a través de la degradación de contaminantes (Chekol

et al., 2004; Wenzel, 2009). Con todo lo mencionado en consideración, es importante estudiar la comunidad bacteriana asociada a las plantas, y su respuesta a diferentes variables y escenarios para comprender o controlar mejor la eficacia de la fitorremediación.

Los ciclos del azufre y el nitrógeno son cada vez más relevantes en el contexto mundial actual. Las concentraciones de nitrógeno y azufre totales en distintos ambientes naturales se ven aumentados por aportes antropogénicos, lo que provoca cambios en el equilibrio entre las especies químicas de ambos ciclos (Gu et al., 2012; Koirala & Brözel, 2021). Estos dos ciclos biogeoquímicos además interactúan a través de reacciones redox (Y. Li et al., 2018), y tanto las bacterias reductoras de azufre como las bacterias reductoras de nitrato compiten por formas de carbono orgánico (Gu et al., 2012). Ambos ciclos están bien descritos, con vías metabólicas, enzimas y grupos bacterianos implicados documentados en varios artículos y libros (Barton et al., 2014; Kuypers et al., 2018). El efecto de la concentración de nutrientes sobre las comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno y el azufre puede tener efectos en el balance de las especies de estos compuestos y afectar positiva o negativamente el medio ambiente (Wang et al., 2018). Por ello, estudiar el efecto de *S. californicus* en las comunidades bacterianas involucradas en los ciclos del nitrógeno y el azufre que ocurren en el ambiente próximo a la totora en un contexto de fitorremediación.

En este estudio, evaluamos el efecto de un gradiente de nutrientes en las comunidades bacterianas involucradas en los ciclos biogeoquímicos del azufre y el nitrógeno en sedimentos y perifiton en un sistema artificial de mesocosmos con Totorá cultivada *in vitro* en un contexto de fitorremediación a una altitud extrema (3400 m.s.n.m.). Hipotetizamos que la formación de un gradiente de nutrientes promoverá cambios en la diversidad de la comunidad bacteriana involucrada en los ciclos del azufre y el nitrógeno. Como objetivo buscamos ver qué grupos son afectados por el gradiente de nutrientes en sedimentos y perifiton, y formular hipótesis sobre el posible efecto que pueden tener en el medio ambiente y la función que puedan desempeñar en procesos de fitorremediación.

2. Materiales & Métodos

2.1. Construcción del Sistema de mesocosmos

Se construyó un sistema de nueve mesocosmos consecutivos (M1 - M9 de ahora en adelante) para estudiar el efecto de Totorá y de un gradiente de nutrientes asociado a un proceso de fitorremediación sobre las comunidades bacterianas (Figura 1 y Figura S1). Cada mesocosmos individual era un tanque rectangular de 500 L de capacidad (Altura: 41 cm, Ancho: 65 cm y Largo: 197 cm). A cada tanque se le añadieron aproximadamente 20 cm de arena como sustrato sobre el

que se plantaron plantines de alrededor de 20 cm de *S. californicus* crecidos *in vitro* y previamente aclimatados bajo invernadero. Los mesocosmos se mantuvieron con una columna de agua de aproximadamente 30 cm para permitir que los especímenes de *S. californicus* se asentaran y se adaptaran a las condiciones de los mesocosmos. El periodo de aclimatación duro tres meses desde febrero del 2021 hasta mayo del 2021. El estudio se lo realizó una vez que las plantas estuvieron aclimatadas y creciendo dentro de los sistemas. Nos aseguramos de que al momento del muestreo hubiera variabilidad en la biomasa vegetal entre cada mesocosmos debido al gradiente de nutrientes generado (Arce y Acha, información no publicada).

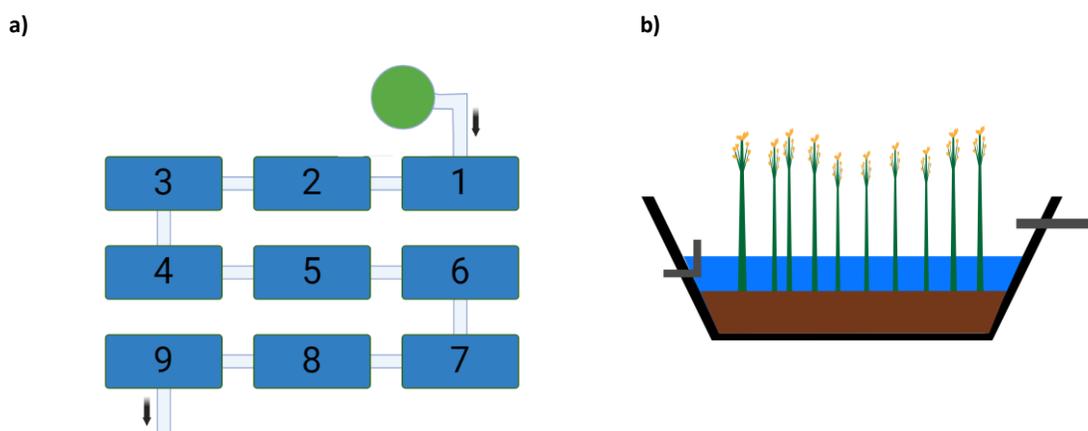


Figura 1. a) Representación del sistema de mesocosmos. Los cuadrados azules numerados representan los nueve mesocosmos que componen el sistema piloto de biorremediación. Los rectángulos blancos entre los cuadrados azules representan las tuberías flexibles que conectan los mesocosmos. El agua fluye desde una fuente cercana hacia M1 y se desborda hacia M2, y así sucesivamente. El agua desborda del sistema hacia una canaleta desde M9. Un tanque lleno de *Lemna sp.* (M0, círculo verde) también aportaba agua y nutrientes al sistema de mesocosmos. b) Esquema de un mesocosmos individual. En este esquema, la entrada de agua es a través de tubería flexible (derecha) y la salida (izquierda) esta elevada de manera que el nivel de agua supere aproximadamente los 30 cm desborde hacia el siguiente mesocosmos.

El sistema de mesocosmos se construyó dentro de un recinto cercado dentro de la Universidad Mayor de San Andrés, Campus de Cota Cota (16°32'14.23 "S, 68° 4'2.71 "W; 3408 m.s.n.m). Tras el periodo de aclimatación, se conectó al sistema un tanque cilíndrico (Altura: 69 cm; Base: 209 cm; Tapa: 245 cm) de suministro de nutrientes de 2500 L de capacidad (M0 de ahora en adelante) a través de M1 (Figura 1). El M0 fue llenado de agua y poblado con *Lemna sp.*. En el proyecto estaba pensado añadir agua del río Katari, y la presencia de *Lemna sp.* estaba pensada para filtrar partículas gruesas que pudieran estar presentes en el agua. Sin embargo, no se llegó a añadir agua del río Katari al sistema, pero las lemnas permanecieron aun en el tanque durante el experimento. El M0 se enmendó con nutrientes (86.62 g de acetato de amonio, 11.91 g de nitrato de amonio y 13.21 g

de dihidrogenofosfato de amonio) una vez a la semana. En total se añadieron aproximadamente 1500 l por semana al M0, y el flujo de agua fue de aproximadamente 1 l por minuto. Las conexiones de tubería entre mesocosmos fueron colocadas de tal forma que una vez superada una cierta altura de la columna de agua (Aprox. 30 cm), esta desbordara al siguiente mesocosmos. El volumen añadido rebalsaba de un mesocosmos al siguiente hasta el M9, del cual el exceso de agua rebalsaba hacia una canaleta y fuera del sistema.

2.2. Medición de concentración de nutrientes y parámetros fisicoquímicos

Para medir las concentraciones de nitratos, nitritos, sulfuros y fosfatos, se tomaron muestras de agua de los nueve mesocosmos con jeringas de 10 ml que posteriormente fueron filtradas con filtros de celulosa de 45 µm. Se colectaron las muestras de agua dentro de 24 horas de añadidos los nutrientes al sistema a través del M0. Las muestras de agua se tomaron hacia el final de cada mesocosmos, una vez que el agua ya había pasado por todo el mesocosmos. El agua se filtró hacia tubos falcon de 50 ml estériles. Las muestras de agua se analizaron inmediatamente después de la filtración para la medición nitritos, nitratos, fosfatos, sulfuros. Quisimos tomar además medidas de amonio en la columna de agua, pero una vez realizadas todas las medidas eran muy cercanas a 0 en M1 – M9, y además no se pudo tener un registro completo de las concentraciones de este nutriente, por lo que no se tomaron en cuenta en este trabajo. Asumimos que todo el amonio fue incorporado a la biota en M0. Se tomaron además datos de concentración de sulfato de una fecha previa para verificar la concentración de sulfatos en la columna de agua (Figura S2), pero no fue posible coleccionar datos posteriores al inicio del funcionamiento del sistema. Todas las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro LaMotte Smart3 (LaMotte, USA) y los kits correspondientes: 3114-02 para fosfatos, 7101-DR-01 para nitrito, 3110-01 para nitrato, 3351-02, 4456-01 para sulfuros y 7778-01 para sulfato. El muestreo y filtración de agua se realizó entre las 8 – 9 AM a las 24 horas de la adición semanal de nutrientes. La demanda química de oxígeno también se midió internamente. El muestreo se realizó de manera semanal y mensual durante ocho meses, aunque para este estudio se tomaron datos de solo tres puntos de muestreo que corresponden a fechas cercanas a la toma de muestras de sedimentos y perfiton (30 de Junio, 30 de Agosto y 6 de Octubre, todas del año 2021).

La variación diaria de parámetros fisicoquímicos se midieron en M0 - M9 sumergiendo una sonda multiparamétrica YSI ProDSS (YSI Inc., Estados Unidos) en la columna de agua cada 3 horas durante 21 horas comenzando a las 12 AM el 21 de Agosto de 2021 (Aproximadamente tres meses luego de

aclimatadas los individuos de Totora) para obtener información sobre las variaciones diarias en el sistema de mesocosmos. Se colectaron datos de oxígeno disuelto, conductividad, concentración de clorofila a, temperatura, sólidos totales disueltos y pH. Para cada punto de muestreo, la sonda se sumergió en la salida de cada mesocosmos apoyada en el sedimento, aproximadamente a 30 cm de profundidad en todos los mesocosmos durante 2 minutos. El registro de datos se realizó cada 10 segundos, dando un total de 12 mediciones por mesocosmos para cada hora. Se reportaron los valores promedios de las 12 mediciones por hora de muestreo y por mesocosmos.

2.3. Muestreo de sedimento y perifiton

Se llevaron a cabo tres rondas de muestreo de sedimentos y perifiton después de que los individuos de Totora estuvieran completamente aclimatados al sistema de mesocosmos. Definimos a la absorción de nutrientes y el crecimiento viable de la Totora como los indicadores de aclimatación, ya que esto sugiere que los individuos de Totora ya no están sometidos a estrés por trasplante y que pueden adquirir sus nutrientes de su medio ambiente. Las muestras de sedimento fueron colectadas usando jeringas autoclavadas de 5 ml con el extremo superior cortado; las muestras fueron colectadas hacia el final de cada mesocosmos. El perifiton se encontró adherido a las totoras y fue colectado manualmente. El perifiton estuvo ausente en algunas fechas de muestreo en algunos mesocosmos, por lo que no se tiene un registro completo de perifiton. Se recogieron un total de 27 muestras de sedimentos y 19 de perifiton. Las muestras se codificaron con una letra identificando el tipo de muestra (S o P), y dos dígitos que indicaban la ronda de muestreo y el mesocosmos del cual provienen, respectivamente (Ej.: S15 para una muestra de sedimento extraída en la primera ronda de muestreo del mesocosmos 5). Todas las muestras se recogieron en tubos estériles y se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento. Las tres rondas de muestreo se realizaron meses luego de poner en funcionamiento el sistema: el 5 de julio de 2021, el 7 de septiembre de 2021 y el 8 de octubre de 2021.

2.4. Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de todas las muestras con los kits de extracción de ADN Soil DNA Extraction KIT (IBI Scientific, USA) siguiendo el protocolo recomendado. Antes de la extracción de ADN, para cada muestra de perifiton se centrifugo 1 g de perifiton a 10000 x g durante 1 min para aislar el perifiton de su contenido de agua. Para los dos tipos de muestra se utilizaron 450 g de muestra para la extracción de ADN. A continuación, las muestras de ADN genómico extraído se purificaron con el sistema de purificación selectiva por tamaño ProNex (Promega, Estados Unidos)

para eliminar todos los fragmentos de ADN menores de 1000 pb; la eliminación correcta de todos los fragmentos de ADN < 1000 pb se verificó por electroforesis en gel de agarosa. La concentración y pureza del ADN (A260/A280 y A260/A230) se midieron con el espectrofotómetro de la serie DS-11 de DeNovix (Tabla S3). Las muestras de ADN genómico purificado se conservaron en un tampón de elución a -20°C hasta su procesamiento posterior.

2.5. Secuenciación MinION y análisis bioinformático

La secuenciación unidimensional del ADNr 16S a partir de ADN genómico purificado y seleccionado por tamaño se llevó a cabo con el secuenciador MinION Mk1B con celdas de flujo R9.4.1 (FLO-MIN106D) (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). El gen ADNr 16S se amplificó con los kits SQB-RAB204 y SQK-16S024. Se utilizaron 12 ng de ADN con las condiciones de PCR de amplificación fueron: (1) Un paso de desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, seguido de (2) 25 ciclos de desnaturalización de 20 segundos a 95°C, hibridación de 30 segundos a 55°C, y extensión de 2 minutos a 65°C, los cuales fueron seguidos de (3) un paso de extensión final de 5 minutos a 65°C. Los productos de PCR marcados con barcode fueron purificados con el sistema de purificación por tamaño ProNex para remover los fragmentos de ADN menores a 1500 bp y así crear las “librerías” que serían posteriormente secuenciadas. En cada secuenciación se utilizaron aproximadamente 8.3 ng por muestra y se secuenciaron un máximo de 12 muestras cada vez, dando un total aproximado de 100 ng de ADN. Cada secuenciación se detuvo luego de que se observara una detención en la generación de nuevas lecturas (o “reads”) en la curva de acumulación de lecturas provista en tiempo real por el programa MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido); todas las secuenciaciones duraron entre 24 y 48 horas. El “basecalling” de los archivos fast5 se realizó con el programa Guppy, integrado en el programa bioinformático MinKNOW con el modelo de alta precisión (High Accuracy). Los archivos FASTQ productos del basecalling se filtraron previamente en Geneious (BioMatters Ltd.) utilizando el plugin BBduk. Las secuencias con un puntaje Q medio < 18, más cortas de 100 pb o más largas de 1500 pb se excluyeron de todos los análisis posteriores.

Los archivos Fastq prefiltrados y recortados fueron cargados al pipeline EzBioCloud (Yoon et al., 2017), lo cual generó Perfiles Taxonómicos del Microbioma (MTP) para cada muestra. Las Unidades Taxonómicas Operacionales (UTO) se agruparon mediante el método de referencia abierta y se asignaron calculando la identidad de cada UTO frente a la base de datos PKSSU4.0 de EzBioCloud para bacterias con un límite del 97% con el programa VSEARCH (Rognes et al., 2016). Posteriormente, la detección de quimeras se realizó dentro del pipeline con UCHIME (Edgar et al.,

2011). La abundancia de todos los taxones se normalizó para el número de copias del gen 16S ADNr. Se obtuvieron las métricas de diversidad alfa (índices de diversidad de Shannon, número de especies encontradas, número de UTO encontradas) y el índice de cobertura de la biblioteca de Good (Good, 1953) para todas las muestras.

Para las 46 muestras, se obtuvo una lista de UTOs a nivel de género a partir de los resultados de los MTP, lo que resultó en un total de 6206 géneros bacterianos detectados entre las 46 muestras. Dado que estábamos interesados en estudiar la comunidad bacteriana involucrada en los ciclos del azufre y el nitrógeno, seleccionamos géneros relevantes de esta lista. Los géneros se seleccionaron en función de si estaban registrados en la lista taxonómica de los siguientes módulos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) (Kanehisa et al., 2023): Fijación del nitrógeno (M00175), Nitrificación (M00528), Desnitrificación (M00529), Reducción disimilatoria del nitrato (M00530), Asimilación del nitrato (M00615), Oxidación del tiosulfato por el complejo SOX (M00595), Reducción disimilatoria del sulfato (M00596), Fotosíntesis anoxigénica en bacterias púrpuras (M00612) y Asimilación del sulfato-azufre (M00616). El filtrado de la lista de 6206 géneros basado en las taxonomías de los módulos mencionados dio como resultado 319 géneros que se utilizaron para todos los análisis estadísticos siguientes. Estos 319 géneros comprendieron entre el 8.21% al 42.28% de toda la comunidad bacteriana las 46 muestras (promedio 23.42%) (Tablas S1 y S2). Esta comunidad filtrada se denominará de aquí en adelante Comunidad Bacteriana del Azufre y el Nitrógeno (CBAN).

2.6. Análisis estadístico

2.6.1. Efecto de la concentración de nutrientes en la comunidad bacteriana

Para evaluar el efecto del gradiente de nutrientes en la composición de la CBAN se realizó un análisis canónico de correspondencias restringido (CCA). Las abundancias relativas de los 319 géneros que conforman el CBAN en las 46 muestras se utilizaron como variables dependientes, y las concentraciones de los cuatro nutrientes (nitratos, nitritos, fosfatos y sulfuro) como variables ambientales. El CCA se realizó por separado para cada tipo de muestra, analizando todas las muestras para cada tipo. Posteriormente, si se encontró un efecto significativo de la concentración de los cuatro nutrientes en la comunidad bacteriana, se realizó una prueba de ANOVA con 9999 permutaciones para evaluar si había un efecto significativo de las concentraciones de nutrientes sobre la abundancia relativa de los grupos bacterianos. El análisis de CCA se llevó a cabo en R (versión 4.2.3) con el paquete *vegan* (versión 2.6-4).

2.6.2. Efecto de las abundancias de bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno en la recuperación de nitrato

En la medición de nitratos en la columna de agua, notamos una recuperación en la concentración de nitratos en las tres fechas analizadas en los últimos mesocosmos, y quisimos verificar si esto podría estar explicado por la variación en la abundancia relativa de ciertos grupos bacterianos. Se emplearon modelos lineales generalizados para averiguar si las abundancias relativas de géneros bacterianos específicos en el CBAN influían en la recuperación de las concentraciones de nitrato. La "fase de recuperación" del nitrato se determinó visualmente inspeccionando los gráficos de concentración de nutrientes (Ver resultados, Figura 3), por lo cual sólo se consideraron las muestras de M5 - M9 del primer muestreo, M2 - M9 del segundo muestreo y M5 - M9 del tercer muestreo. Los diez géneros más abundantes (entre nitrificantes y fijadores de nitrógeno) de la CBAN para cada tipo de muestra se eligieron como variables independientes y las concentraciones de nitrato no transformadas (en ppm) se utilizaron como variable dependiente. Si las variables independientes mostraban factores de inflación de la varianza superiores a 5, la variable con el valor más alto se eliminaba del modelo, y esto se repetía hasta que todas las variables independientes mostraban factores de inflación de la varianza con valores inferiores a 5 (Craney & Surles, 2002). Este análisis dio como resultado seis géneros (*Geobacter*, *Rhodobacter*, *Dechloromonas*, *Raoutella*, *Sideroxydans* y *Sulfuricurvum*) utilizados como variables independientes para las muestras de sedimentos, y 5 géneros (*Rhodobacter*, *Hydrogenophaga*, *Novosphingobium*, *Raoutella*, *Rhodoferrax* y *Thiodictyon*) para el perifiton. La fecha de muestreo también se añadió como variable categórica para ambos tipos de muestras con los siguientes niveles: Primera, Segunda y Tercera. Ambos modelos se realizaron utilizando la familia *gaussian* con una función de enlace logarítmico en R 4.2.3. Posteriormente se obtuvo un resumen de cada modelo para determinar si cada género afectaba significativamente a la concentración de nitrato en la columna de agua ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Resultados generales fisicoquímicos y de diversidad alfa

La medición de los parámetros fisicoquímicos de M1 - M9 se llevó a cabo para proporcionar información sobre las variaciones diarias en el hábitat de las comunidades bacterianas. Se obtuvieron rangos de valores para: Oxígeno óptico disuelto: 0.97 – 17.79 mg/l; Clorofila α : 2.61 – 407.42 $\mu\text{g/l}$; Conductividad: 91.22 – 263.94 $\mu\text{S/cm}$; Temperatura: 7.78 – 23.30°C; pH: 6.97 – 9.96;

Sólidos totales disueltos: 75 - 128 mg/l. Gráficamente, se observaron patrones generales para todas estas métricas (Figura 2).

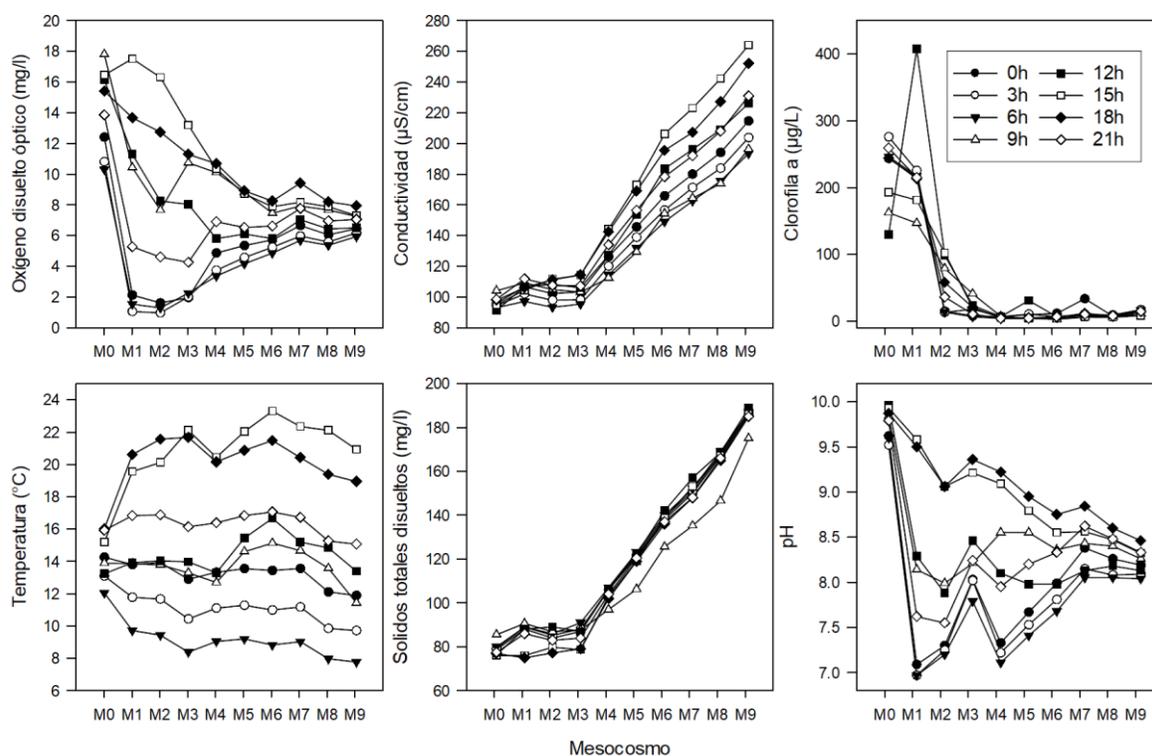


Figura 2. Parámetros fisicoquímicos medidos en todo el sistema de mesocosmos a diferentes horas. Los parámetros fisicoquímicos se midieron cada 3 horas a partir de las 12 AM (0h) del 21 de agosto de 2021.

El pipeline de EZBioCloud entregó resultados de métricas de diversidad alfa de todas las muestras analizadas de perifiton y sedimento (Tablas S1 y S2). La mayoría de las muestras tenían un Índice de Cobertura de Biblioteca de Good superior al 90%; solo las muestras P32 y S54 mostraron valores menores a 90% (85.0% y 84.3%, respectivamente), por lo que tenemos un alto grado de confianza en los resultados de la secuenciación y el análisis bioinformático. Las muestras de sedimento tenían, en promedio, métricas de diversidad alfa más altas comparadas con las de perifiton, incluyendo el número de especies encontradas (2466 vs 637), valores del índice de diversidad de Shannon (5.464 vs 4.128) y UTOs encontradas (1979 vs 1038). A nivel de especie (Tablas S1 y S2), la prueba U de Mann-Whitney detectó diferencias significativas en los valores del índice de diversidad de Shannon entre ambos tipos de muestras ($U = 244.5$, $p < 0.05$).

La composición de la comunidad en las muestras de sedimento y perifiton fue significativamente diferente (PERMANOVA: $F = 5.5816$, $gl = 1$, $p < 0.01$), demostrado gráficamente en la composición de filotaxa (Figura 3 y Figura S3). Mientras que Proteobacteria fue el filo dominante en ambos tipos de

muestras, las muestras de sedimento presentaron una menor abundancia relativa de este filo (70.29% frente a 86.14%). Así pues, las muestras de sedimentos presentaban una mayor abundancia relativa de otros filos bacterianos como Planctomycetes, Verrucomicrobia, Firmicutes, Cyanobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria (Figura 3).

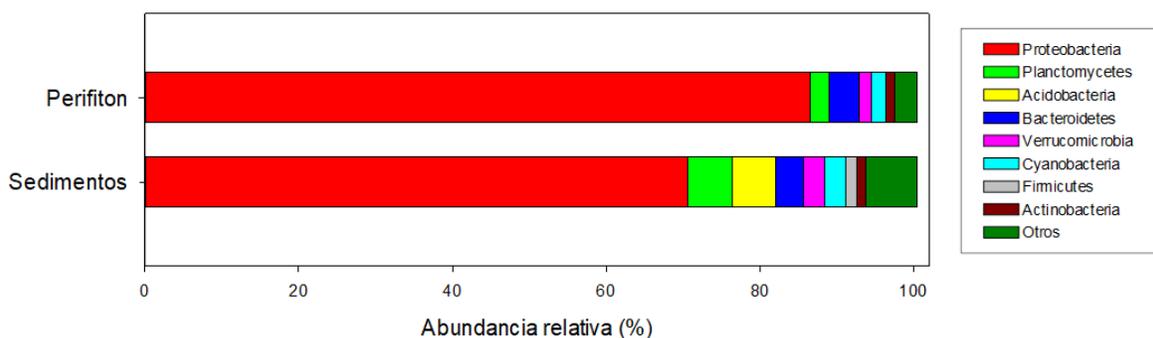


Figura 3. Promedio de las abundancias relativas de los distintos filos en muestras de sedimento y perifiton. "Otros" incluye todos los filos con una abundancia relativa inferior al 1%.

3.2. Efecto de la concentración de nutrientes en la CBAN

El correcto funcionamiento del sistema de mesocosmos se corroboró mediante el gradiente de nutrientes a medida que el agua pasaba de un mesocosmos al siguiente. La concentración de los cuatro nutrientes de interés vario a lo largo del sistema (Figura 4).

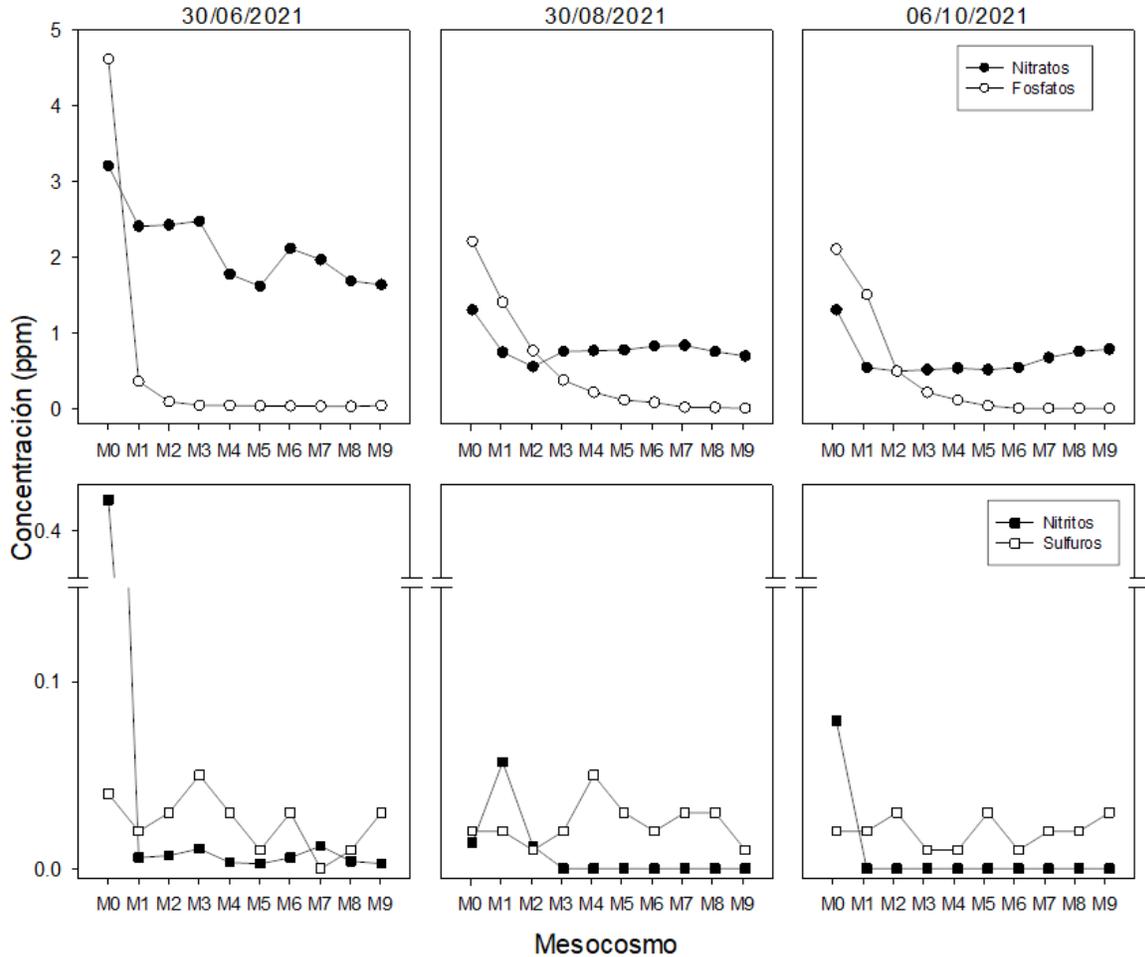


Figura 4. Concentración de nutrientes en el agua del mesocosmos medida en tres fechas tras la aclimatación de *S. californicus*. Arriba: Concentraciones de nitratos y fosfatos. Abajo: Concentraciones nitritos y sulfuros.

Las pruebas de permutación de los resultados del CCA de las abundancias relativas de la CBAN en las 27 muestras de sedimento (Figura 5) detectaron un efecto global significativo de las concentraciones de nutrientes sobre la comunidad bacteriana encontrada en los sedimentos ($gl = 4$, $F = 2.2534$, $p < 0.01$); sin embargo, no se encontró un efecto significativo en las muestras de perifiton ($gl = 4$, $F = 0.7056$, $p > 0.05$). Las pruebas de permutación posteriores de las puntuaciones de los ejes y las concentraciones de nutrientes individuales para las muestras de sedimentos encontraron que los nitritos ($p < 0.05$, $F = 2.890$, $df = 1$) y los fosfatos ($p < 0.01$, $F = 3.967$, $df = 1$) tenían un efecto significativo sobre la composición de la comunidad bacteriana en los sedimentos. Modelos lineales del efecto de la concentración de nitrito y fosfato sobre la abundancia relativa de ciertos géneros desglosan los resultados mostrados por CCA (Tabla S5).

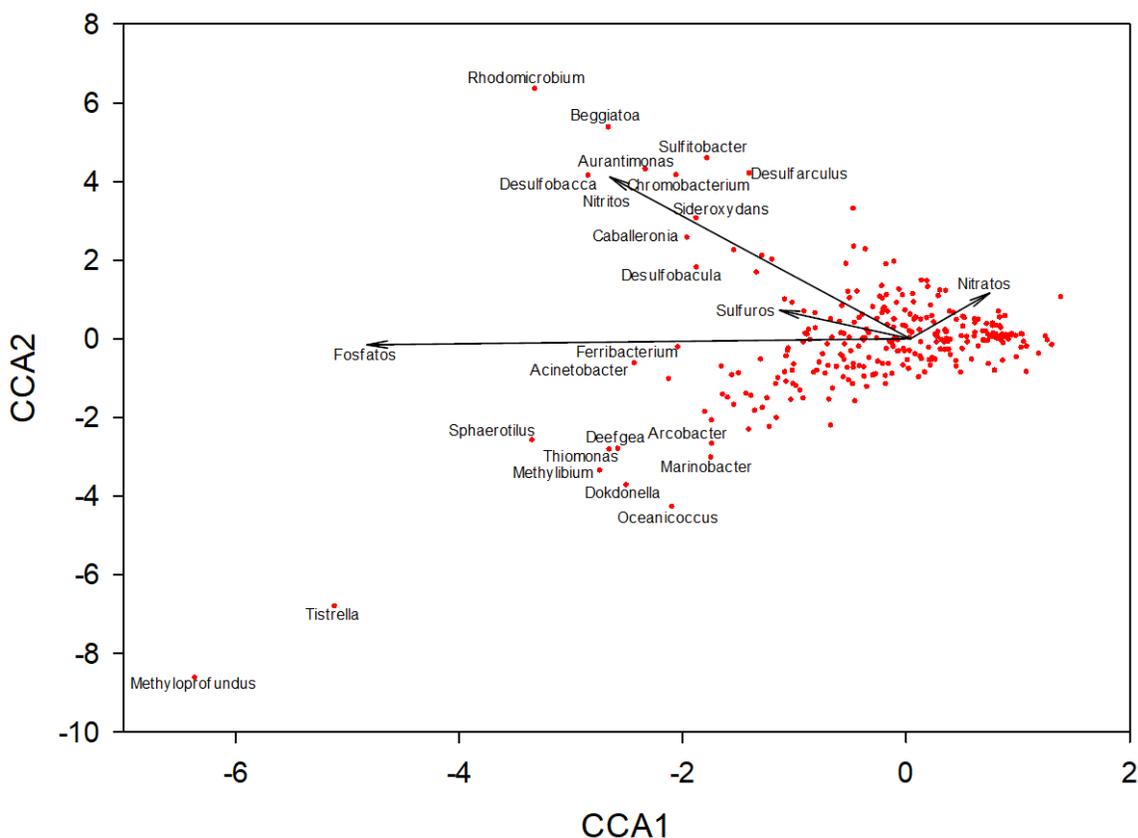


Figura 5. Gráfico CCA de los 319 géneros bacterianos relevantes analizados (puntos rojos) y las cuatro concentraciones de nutrientes como variables explicativas (flechas) en las 27 muestras de sedimentos. Los géneros que aparecen afectados gráficamente por las concentraciones de nitrito y fosfato se etiquetan con el nombre del género. Las puntuaciones de las variables explicativas se han escalado 5.5 veces.

3.3. Efecto de la abundancia relativa bacteriana en la recuperación de nitrato

Para cada tipo de muestra se eligieron géneros nitrificantes y fijadores de nitrógeno que posiblemente pudieran explicar la recuperación de nitrato en los mesocosmos y se realizó un modelo lineal generalizado, obteniendo los coeficientes para cada variable independiente (géneros bacterianos) y verificar si cada uno tenía un efecto significativo (Tabla 1). Ninguno de los géneros bacterianos evaluados tuvo un efecto significativo en la recuperación de las concentraciones de nitratos tanto en las muestras de sedimento como en las de perifiton. Las fechas de muestreo tuvieron un efecto significativo sobre las concentraciones de nitrato.

Tabla 1. Estimación y valores de significación de las variables independientes (géneros) en los niveles de nitrato. El efecto del muestreo (tercero y segundo) se midió con respecto a la primera ronda de muestreo como control.

Sedimentos			Perifiton		
Termino	Estimado	P	Termino	Estimado	P
Intercepto	0.4769	< 0.05	Intercepto	0.8594	< 0.001
Geobacter	0.2448	0.1265	Rhodobacter	-0.1266	0.1814
Rhodobacter	0.0627	0.7471	Hydrogenophaga	0.0227	0.8429
Dechloromonas	-0.1299	0.0760	Novosphingobium	-0.0594	0.7868
Raoutella	0.1450	0.5758	Rhodoferax	0.0176	0.7717
Sideroxydans	0.0588	0.5748	Thiodictyon	0.4733	0.1307
Sulfuricurvum	-0.6018	0.0712	Sampling (Second)	0.8596	< 0.001
Sampling (Second)	-0.9316	< 0.001	Sampling (Third)	0.9681	< 0.05
Sampling (Third)	1.0710	< 0.001			

4. Discusión

4.1. Generalidades

El sedimento en este estudio albergo una comunidad bacteriana más diversa que el perifiton. Esto se aprecia gráficamente a nivel de filo (Figura 3), y a nivel de especie con los valores del Índice de Diversidad de Shannon y UTOs, los cuales son más altos en promedio en sedimentos (Tablas S1 y S2). Una posible causa de la menor diversidad bacteriana en el perifiton es la naturaleza secuencialmente conectada de los mesocosmos, permitiendo que el perifiton de un mesocosmos colonice otros mesocosmos aguas abajo. Las plantas tienen formas de seleccionar bacterias dentro de su microbiota (Berendsen et al., 2012), y a medida que la biomasa de totora disminuye, la comunidad bacteriana contenida dentro de los sedimentos cambia (PERMANOVA: $F = 5.5816$, $gl = 1$, $p < 0.001$). Los sedimentos al mismo tiempo podrían ofrecer gradientes más pronunciados de factores fisicoquímicos como el oxígeno y el potencial redox que promuevan una mayor diversidad en la comunidad bacteriana (Santschi et al., 1990).

Los parámetros fisicoquímicos nos dan una idea general del hábitat de estas comunidades bacterianas (Figura 2). Medir las variaciones diarias en los parámetros fisicoquímicos es importante en ambientes de altura debido a que las variaciones diarias son más extremas que las variaciones anuales (Alanoca et al., 2016). Los parámetros fisicoquímicos a su vez demuestran que muchos de los procesos biológicos de asimilación de nutrientes ocurren en M0 antes de que el agua entre al sistema de mesocosmos donde se encuentran los individuos de totora (Figura 1).

En general, se aprecia gráficamente una marcada diferencia entre M1 - M3 y M4 - M9 en las mediciones fisicoquímicas como conductividad, sólidos disueltos totales, contenido de clorofila a y

oxígeno disuelto (Figura 1). Es importante señalar que todas las muestras de perifiton y sedimento se tomaron entre las 10 AM y las 12 PM, por lo que las comunidades bacterianas deben analizarse teniendo en cuenta que las abundancias relativas bacterianas detectadas en este trabajo pueden estar condicionadas por las condiciones fisicoquímicas presentes a estas horas. M1 - M3 mostraron tendencias para los diferentes parámetros fisicoquímicos medidos, que luego cambiarían de M4 en adelante. Este fenómeno está posiblemente relacionado con la disminución observada en la capacidad de supervivencia de *S. californicus* a medida que los nutrientes se hacían más escasos en la columna de agua, lo que tendría entonces un impacto en las propiedades fisicoquímicas circundantes de la columna de agua debido a la menor cantidad de materia orgánica (Arce y Achá, información no publicada).

Las concentraciones de clorofila a y de oxígeno disuelto nos dan una idea de lo que ocurre con la producción primaria del sistema de mesocosmos (Figura 2). El contenido de clorofila a en general disminuyó desde M0 a M9, indicando una disminución de productores primarios a lo largo del sistema ligada a la disminución de nutrientes (Figura 4). El oxígeno disuelto también mostró concentraciones más bajas en los mesocosmos con mayor contenido de clorofila a antes de recuperarse hacia el final del sistema. La disminución de oxígeno fue más aguda de M0 - M1 durante la noche y temprano en la mañana (0h a 6h) debido a la falta de actividad fotosintética y a la respiración de los productores primarios. Esto coincide con lo que ocurre en cuerpos de agua dulce donde la eutrofización resulta en un consumo de oxígeno disuelto por parte de los productores primarios en ausencia de luz solar (Foley et al., 2012). Los valores de oxígeno disuelto luego se estabilizan en torno a 6 - 7 mg/l hacia el final del sistema (Figura 2), lo que concuerda con lo que ocurre en cuerpos de agua a elevadas altitudes (Achá et al., 2018) en ausencia de una fuerte productividad y respiración debido a la falta de nutrientes.

La conductividad se mantuvo estable de M0 a M3 y empezó a aumentar a partir de M4 en todos los tiempos de medición. El aumento de conductividad a lo largo del sistema puede estar relacionado al aumento de iones. Si bien los iones (nitratos, fosfatos, nitritos y sulfuros) que hemos estudiado en este trabajo disminuyen a lo largo del sistema (excepto el nitrato), creemos que el aumento de la conductividad podría estar dada por otros iones no medidos en este trabajo. El aumento de los iones mencionado a su vez podría estar relacionado con la disminución de superficies de absorción producto de la menor biomasa de *S. californicus* a lo largo del mesocosmos (Arce & Achá, información no publicada).

4.2. Efecto de la concentración de nutrientes en la CBAN en sedimentos y perifiton

De los cuatro nutrientes (nitritos, sulfuros, nitratos y fosfatos) medidos en este trabajo, se encontró que los fosfatos y los nitritos podrían ser los que influyen la abundancia relativa de los géneros de la CBAN en muestras de sedimentos (Figura 5 y Tabla S5). Tanto el fósforo como el nitrógeno son factores limitantes de la producción primaria en los ecosistemas de agua dulce (Elser et al., 2007). Los fosfatos son un nutriente importante para las bacterias, ya que constituyen la biomasa de ácidos nucleicos y ATP para la generación de energía. Las bacterias compiten por fosfatos (Jansson, 1988); las bacterias más afectadas por las altas concentraciones de fosfato en este estudio podrían ser aquellas menos aptas en adquirir fosfato del ambiente en relación a otros clados bacterianos. Por su parte, los nitritos son un compuesto intermedio en el ciclo del nitrógeno, que sirven como sustrato para la reducción a amoníaco en las vías de desnitrificación (o reducción disimilatoria/asimilatoria de nitratos) y para la oxidación a nitrato en las vías de nitrificación (Daims et al., 2016). Ren et al., 2019 describen el efecto de la concentración de nutrientes en la comunidad bacteriana en el Lago Poyang, específicamente como las concentraciones de nitrógeno y fósforo influyen la comunidad bacteriana encontrada en sedimentos lacustres y de ríos. La sensibilidad de las comunidades bacterianas del sedimento a la concentración de nutrientes podría ser un indicador de que estas comunidades bacterianas son las que responden frente a cambios ambientales que ameritarían procesos de biorremediación como contaminación por metales u otros compuestos (Rehman et al., 2019). En contraste con las muestras de sedimento, la concentración de los cuatro nutrientes no afectó significativamente la CBAN encontrado en las muestras de perifiton en el sistema de mesocosmos. El perifiton está rodeado por una biopelícula formada por sustancias poliméricas extracelulares (Miao et al., 2021) y que depende de su planta huésped para obtener materia orgánica y nutrientes, lo que haría a estas comunidades menos susceptibles a cambios en el medio ambiente (Eminson & Moss, 1980).

4.3. Relación entre nutrientes disueltos en la columna de agua y abundancia relativa de géneros bacterianos de la CBAN en sedimentos

La mayoría de los géneros del CBAN en las muestras de sedimento no mostraron correlación con las concentraciones de nutrientes (Figura 4). Sin embargo, las concentraciones de nitrato y fosfato promovieron mayores abundancias relativas de ciertos géneros en los sedimentos de mesocosmos poblados por *Schoenoplectus californicus* (Tabla S6). De los 22 géneros mencionados en la Tabla S6, 15 géneros (*Aurantimonas*, *Beggiatoa*, *Caballeronia*, *Chromobacterium*, *Deefgea*, *Dokdonella*,

Ferribacterium, *Methylibium*, *Methyloprofundus*, *Oceanicoccus*, *Rhodomicrobium*, *Sphaerotilus*, *Sulfitobacter*, *Thiomonas* y *Tistrella*) pertenecen al filo Proteobacteria, el filo más abundante en las muestras de sedimento (Figura 3).

Varios de los géneros bacterianos que se vieron influidos positivamente por las concentraciones de nitritos y fosfatos eran bacterias del azufre (Figura 5 y Tabla S5). *Desulfarculus*, *Desulfobacca* y *Desulfobaccula* son géneros bacterianos reductores de sulfato; *Beggiatoa*, *Sulfitobacter* y *Thiomonas* son oxidantes de azufre (Barton et al., 2014). Las interacciones entre estos géneros y el medio ambiente podrían afectar al equilibrio de los compuestos de azufre en la columna de agua. Las concentraciones de sulfuro en el sistema se mantuvieron en concentraciones bajas (< 0.01 ppm) en todas las muestras (Figura 1). Sin embargo, esto podría ser consecuencia de la baja altura de la columna de agua (30 cm aprox.) en los mesocosmos, lo que permite que el agua esté bien oxigenada y se oxiden las especies de sulfuro. La totora también podría oxigenar la columna de agua y los sedimentos bombeando oxígeno desde sus partes aéreas. Sin embargo, la oxidación del sulfuro de hidrógeno tiende a ser un proceso cinéticamente lento que no podría explicar por sí solo las bajas concentraciones observadas (Luther et al., 2011). La presencia de los oxidantes de azufre mencionados puede ser un factor crítico en el control de las concentraciones de H₂S en el sistema. Es importante tener en cuenta el efecto de estos géneros bacterianos en el equilibrio de azufre de las masas de agua si se va a utilizar *S. californicus* en esfuerzos de fitorremediación (Achá et al., 2018; Foley et al., 2012).

Las mayores concentraciones de nitrito y fosfato también promovieron la proliferación de géneros bacterianos implicados en el ciclo de los metales (Tabla S5). A pesar de que no se evaluó la transformación de metales en este estudio, la proliferación de estos grupos nos da una base de posibles mecanismos de fitorremediación de metales. *Sphaerotilus* es un género con capacidad de bioabsorción de cadmio y cobre (Esposito et al., 2001). *Sideroxydans* es un género oxidador del Fe(II) en medios acuáticos, incluidos los ecosistemas de agua dulce (Liu et al., 2012); *Ferribacterium* a su vez es un género reductor del Fe(III) (Cummins et al., 1999). La biorremediación del hierro depende primero de su oxidación (Teixeira et al., 2014), y las abundancias y actividades de estos dos géneros puede influenciar la especiación del hierro, dificultando o facilitando su remoción o inmovilización en cuerpos de agua. La proliferación del género *Ferribacterium* se ha detectado además en la rizosfera de *Phragmites australis* y *Typha augustifolia* (Y. H. Li et al., 2013). La especiación del hierro es particularmente importante si consideramos la presencia de azufre y fosfato, ya que el Fe(II)

reacciona con sulfuro formando FeS y promueve la liberación de fosfatos del sedimento (Wu et al., 2019). Estudios controlados que corroboren el efecto de la comunidad bacteriana en las concentraciones y especiación de estos metales en presencia de *S. californicus* deben ser realizados para dilucidar el posible efecto que pueden tener en el medio ambiente.

Otros géneros posiblemente útiles en un contexto de biorremediación tienen vías relacionadas con la degradación de hidrocarburos (Tabla S5). Algunas especies del género *Dokdonella* contienen vías metabólicas que pueden permitirle degradar hidrocarburos poliaromáticos en sedimentos marinos (Dell' Anno et al., 2021), y se ha descrito su proliferación en trabajos de biorremediación con *Festuca L.* (Dai et al., 2020); Se ha reportado que algunas especies del género *Marinobacter* prolifera en enriquecimientos de petróleo crudo en medios marinos y que degrada las cadenas de hidrocarburos (Chernikova et al., 2020; Dell' Anno et al., 2021). La fitorremediación depende de la proliferación de determinados grupos microbianos responsables de la eliminación/inmovilización de los compuestos objetivo (Ma et al., 2018; Rehman et al., 2019; Shahid et al., 2018). La proliferación de estos dos géneros podría tener implicaciones para la biorremediación de masas de agua contaminadas con hidrocarburos con *S. californicus*. Sin embargo, las propiedades biorremediadoras de estos dos géneros sólo se han estudiado en ambientes marinos; su funcionamiento en ambientes de agua dulce puede ser diferente y debe ser estudiado.

Se encontraron reductores de nitrato en mayor abundancia relativa en concentraciones más elevadas de fosfato y nitrato (Tabla S5). *Methylococcus*, *Methyloprofundus* y *Methylibium* se describen como géneros metanotróficos (fílicos) (Whittenbury & Dalton, 1981). Los metanótrofos utilizan exudados de raíces como sustratos para la degradación (Serrano-Silva et al., 2014), lo que podría explicar la proliferación de los géneros antes mencionados en los suelos poblados por *S. californicus*. Los metanótrofos reducen el nitrato a nitrito para la oxidación del metano (Chistoserdova et al., 2009; Whittenbury & Dalton, 1981), lo que las convierte en actores importantes del ciclo del nitrógeno. *Chromobacterium* es otro género denitrificador (Grant & Payne, 1981) influido positivamente por concentraciones más elevadas de nitritos. La eliminación de nitratos es un proceso importante en la biorremediación de aguas contaminadas con nitrógeno (Camargo et al., 2005). La proliferación de metanótrofos y otros géneros bacterianos reductores de nitratos podría ser importante en la eliminación de nitrógeno de hábitats de agua dulce mediada por *S. californicus* una vez superada la capacidad de esta macrófita para remover nutrientes del agua.

Las altas concentraciones de nutrientes promovieron una mayor abundancia relativa de bacterias beneficiosas para *S. californicus* (Tabla S5). *Caballeronia* es una bacteria fijadora de nitrógeno que favorece el crecimiento de las plantas en condiciones de bajo contenido en nitrógeno (South et al., 2021). *Acinetobacter* es un género solubilizador de fosfato que hace que el fósforo esté disponible para su absorción por las plantas, promoviendo su crecimiento (Rodríguez & Fraga, 1999). *Caballeronia* y *Acinetobacter* podrían formar parte de la rizosfera que *S. californicus* promueve en sus proximidades como bacterias beneficiosas a través de los exudados radiculares (J. Li et al., 2021). Hasta donde sabemos, no se ha estudiado la rizosfera de *S. californicus*, por lo que serían necesarias más investigaciones sobre este tema para identificar los géneros bacterianos clave.

4.4. Recuperación de nitrato en mesocosmos de *S. californicus*

La concentración de nitrato aumentó en los mesocosmos más alejados del M0 en las tres fechas de medición (Figura 4). Queríamos comprobar si este aumento de la concentración de nitrato podía relacionarse con la abundancia relativa de determinados géneros bacterianos relevantes presentes en los sedimentos y/o el perifiton, como las bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes. La fijación de nitrógeno por grupos bacterianos como cianobacterias aumenta en medios acuáticos pobres en nitrógeno (Paerl, 2017), por lo que un aumento del nitrato mediado por bacterias en este sistema de mesocosmos sería coherente con lo que ocurre en otros medios acuáticos de agua dulce. A pesar de ello, no se encontró un efecto significativo de las abundancia relativas de bacterias nitrificadoras o fijadoras de nitrógeno (Tabla 1) sobre la recuperación de los niveles de nitrato en el agua en ninguno de los dos tipos de muestra.

Existen otras posibles explicaciones para el aumento de las concentraciones de nitrato no relacionadas únicamente con la abundancia relativa de las bacterias nitrificadoras o fijadoras de nitrógeno. Los géneros bacterianos fijadores de nitrógeno y nitrificantes pueden causar el aumento de la concentración de nitrato a través de una mayor actividad metabólica en cuerpos de agua dulce (Daims et al., 2016). Sin embargo, en este estudio no medimos la actividad metabólica de las comunidades bacterianas dentro de los sedimentos y el perifiton, sólo sus abundancias relativas medidas según 16S. Además, en este estudio no evaluamos la comunidad en la columna de agua, que es probable que haya jugado un papel importante en el control de las concentraciones de nitrógeno en la columna de agua. Por otra parte, la fijación del nitrógeno y la nitrificación pueden ser llevadas a cabo por otros microorganismos como las arqueas o algas eucariotas (Martens-Habbena et al., 2009). La Demanda Química de Oxígeno mostró una tendencia a aumentar en dos

de las fechas de muestreo (Figura S4), lo que podría ser el resultado de la liberación de materia orgánica vegetal muerta de los primeros mesocosmos, que podría haber sido la causa del aumento de la concentración de nitrato hacia el final del sistema en las tres fechas. Esto vinculado a la disminución de superficies de absorción podría explicar la acumulación de nitratos (Arce y Acha, información no publicada). El incremento en la concentración de nitrato podría ser un factor desconocido e importante a considerar en la fitorremediación *in situ* con *S. californicus* y debería ser estudiado más a fondo.

5. Conclusión

Este estudio se evaluó la relación entre un gradiente de nutrientes generado por mesocosmos poblados por *Schoenoplectus californicus* y la comunidad bacteriana involucrada en los ciclos del azufre y el nitrógeno encontrada en sedimentos y perifiton. Específicamente, se vio una correlación de los gradientes de fosfatos y nitritos con las abundancias relativas de bacterias en la comunidad bacteriana encontrada en sedimentos. Por otro lado, no se encontró evidencia de que existieran correlaciones entre la concentración de nutrientes del agua y la composición de la comunidad bacteriana en perifiton. En adición, se estableció de manera preliminar que las concentraciones altas de nitritos y fosfatos promovieron la proliferación de géneros bacterianos específicos como bacterias reductoras del azufre como *Desulfarculus*, *Desulfobacca* y *Desulfobaccula*, y géneros oxidadores del azufre como *Beggiatoa*, *Sulfitobacter* y *Thiomonas*. Se encontró además efecto del gradiente de nutrientes sobre algunos grupos que pueden estar involucrados en procesos de fitorremediación en el sedimento como *Sphaerotilus*, *Sideroxydans*, *Ferribacterium*, *Dokdonella* y *Marinobacter*. La proliferación de bacterias reductoras de sulfato y oxidadores de azufre a mayores concentraciones de nutrientes bajo la influencia de *S. californicus* es particularmente importante en masas de agua con altas concentraciones de sulfato, ya que puede cambiar la especiación del azufre en el ambiente y afectar otros compuestos en el agua como hierro y la concentración de fosfatos. Otras consideraciones, como la proliferación de metanótrofos y la posible liberación de nitratos de la materia orgánica de la Totorá, podrían tener importantes implicaciones para el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en cuerpos de agua donde se utiliza *S. californicus* ya que estos grupos pueden afectar el nivel de nitratos.

De manera general, los resultados de este estudio nos dan una primera idea de los mecanismos subyacentes que pueden afectar las abundancias relativas de géneros bacterianos en sedimentos en un gradiente de nutrientes dado por la presencia de *S. californicus*. Otro componente importante

para estudios a futuro es la actividad metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a *S. californicus*, específicamente el estudio de vías de metabolismo de metales, ya que se ha visto que en condiciones de altas concentraciones de nutrientes proliferan bacterias como *Sphaerotilus*, *Sideroxydans* y *Ferribacterium*. *S. californicus* es un buen candidato para la remediación de aguas eutróficas y afectadas por otros tipos de contaminación, y el seguimiento de la comunidad bacteriana *in situ* podría revelar información sobre mecanismos de biorremediación o riesgos potenciales para el medio ambiente. A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio sobre la relación entre un gradiente de nutrientes en presencia de *S. californicus* y la comunidad bacteriana en compartimientos circundantes como sedimento y perifiton. Con todo esto considerado, los siguientes estudios podrían ahondar en esta relación, enfocándose en grupos bacterianos específicos, considerando los exudados de raíces, la microbiota de la rizosfera inmediata, el ciclo de metales como hierro, cadmio, y cobre y la fitorremediación de entornos naturales.

6. Reconocimientos

Esta investigación fue realizada dentro del marco del proyecto BIOREM (03-B-03 UNDP/GEF Proyecto Piloto “Bioremediación de las zonas de Huatajata y Bahía Cohana del Lago Titicaca y revalorización cultural-económica de la Totorá” como parte del Programa Binacional de Manejo de Recursos Acuáticos Integrado (GIRH TDPS, Peru-Bolivia). El proyecto fue financiado por el Global Environment Fund (GEF) and y el Institut de Recherche pour le Développement (IRD) a través del proyecto TITICACA "Jeune équipe associée à l'IRD" (JEA). Agradecemos a N. Rendon por su ayuda en la extracción de ADN de muestras de sedimento y perifiton. Agradecemos también a R. Quiroga por su ayuda en la optimización del protocolo de secuenciación MinION para las muestras de sedimento y perifiton.

7. Referencias

- Achá, D., Guédron, S., Amouroux, D., Point, D., Lazzaro, X., Fernandez, P. E., & Sarret, G. (2018). Algal bloom exacerbates hydrogen sulfide and methylmercury contamination in the emblematic high-altitude lake titicaca. *Geosciences (Switzerland)*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/geosciences8120438>
- Alanoca, L., Amouroux, D., Monperrus, M., Tessier, E., Goni, M., Guyoneaud, R., Acha, D., Gassie, C., Audry, S., Garcia, M. E., Quintanilla, J., & Point, D. (2016). Diurnal variability and biogeochemical reactivity of mercury species in an extreme high-altitude lake ecosystem of the Bolivian Altiplano. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(7), 6919–6933. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5917-1>
- Barton, L. L., Fardeau, M. L., & Fauque, G. D. (2014). Hydrogen sulfide: A toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. *Metal Ions in Life Sciences*, *14–113*, 237–277. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9269-1_10
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Blanco, J. A. (2019). Suitability of Totora (*Schoenoplectus californicus* (C.A. Mey.) Soják) for its use in constructed Wetlands in Areas Polluted with heavy metals. *Sustainability (Switzerland)*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/su11010019>
- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *7*(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, *58*(9), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Cekol, T., Vough, L. R., & Chaney, R. L. (2004). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environment International*, *30*(6), 799–804. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.01.008>
- Chen, Z., Cuervo, D. P., Müller, J. A., Wiessner, A., Köser, H., Vymazal, J., Kästner, M., & Kusch, P. (2016). Hydroponic root mats for wastewater treatment—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(16), 15911–15928. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6801-3>
- Chernikova, T. N., Bargiela, R., Toshchakov, S. V., Shivaraman, V., Lunev, E. A., Yakimov, M. M., Thomas, D. N., & Golyshin, P. N. (2020). Hydrocarbon-Degrading Bacteria *Alcanivorax* and *Marinobacter* Associated With Microalgae *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.572931>

- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., & Lidstrom, M. E. (2009). The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 477–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600>
- Craney, T. A., & Surlles, J. G. (2002). Model-Dependent Variance Inflation Factor Cutoff Values. *Quality Engineering*, *14*(3), 391–403. <https://doi.org/10.1081/QEN-120001878>
- Cummings, D. E., Caccavo Jr., F., Spring, S., & Rosenzweig, R. F. (1999). *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Archives of Microbiology*, *171*(3), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s002030050697>
- Dai, Y., Liu, R., Zhou, Y., Li, N., Hou, L., Ma, Q., & Gao, B. (2020). Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environment International*, *136*, 105421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105421>
- Daims, H., Lückner, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, *24*(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Dell' Anno, F., Rastelli, E., Sansone, C., Dell' Anno, A., Brunet, C., & Ianora, A. (2021). Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the omics era. *Microorganisms*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>
- Duman, F., Cicek, M., & Sezen, G. (2007). Seasonal changes of metal accumulation and distribution in common club rush (*Schoenoplectus lacustris*) and common reed (*Phragmites australis*). *Ecotoxicology*, *16*(6), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0150-4>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, *10*(12), 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>
- Eminson, D., & Moss, B. (1980). The composition and ecology of periphyton communities in freshwaters. 1 The influence of host type and external environment on community composition. *British Phycological Journal*, *15*(4), 429–446. <https://doi.org/10.1080/00071618000650431>
- Esposito, A., Pagnanelli, F., Lodi, A., Solisio, C., & Vegliò, F. (2001). Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass

- concentrations. *Hydrometallurgy*, 60(2), 129–141.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00195-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00195-X)
- Foley, B., Jones, I., Maberly, S., & Rippey, B. (2012). Long-term changes in oxygen depletion in a small temperate lake: effects of climate change and eutrophication. *Freshwater Biology*, 57(2), 278–289.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02662.x>
- Good, I. J. (1953). The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika*, 40(3/4), 237–264.
<https://doi.org/10.2307/2333344>
- Grant, M. A., & Payne, W. J. (1981). Denitrification by Strains of *Neisseria*, *Kingella*, and *Chromobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31(3), 276–279. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-3-276>
- Gu, C., Laverman, A. M., & Pallud, C. E. (2012). Environmental controls on nitrogen and sulfur cycles in surficial aquatic sediments. *Frontiers in Microbiology*, 3(FEB).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00045>
- Ijaz, A., Imran, A., Anwar ul Haq, M., Khan, Q. M., & Afzal, M. (2016). Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil*, 405(1–2), 179–195. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2606-2>
- Jansson, M. (1988). Phosphate Uptake and Utilization by Bacteria and Algae. En G. Persson & M. Jansson (Eds.), *Phosphorus in Freshwater Ecosystems* (pp. 177–189). Springer Netherlands.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic acids research*, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- Khan, M. N., & Mohammad, F. (2014). Eutrophication: Challenges and solutions. En *Eutrophication: Causes, Consequences and Control* (Vol. 2, pp. 1–15). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7814-6_1
- Koirala, A., & Brözel, V. S. (2021). Phylogeny of nitrogenase structural and assembly components reveals new insights into the origin and distribution of nitrogen fixation across bacteria and archaea. *Microorganisms*, 9(8).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081662>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Li, J., Wang, C., Liang, W., & Liu, S. (2021). Rhizosphere Microbiome: The Emerging Barrier in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.772420>

- Li, Y. H., Zhu, J. N., Liu, Q. F., Liu, Y., Liu, M., Liu, L., & Zhang, Q. (2013). Comparison of the diversity of root-associated bacteria in *Phragmites australis* and *Typha angustifolia* L. in artificial wetlands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(8), 1499–1508. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1316-2>
- Li, Y., Tang, K., Zhang, L., Zhao, Z., Xie, X., Chen, C. T. A., Wang, D., Jiao, N., & Zhang, Y. (2018). Coupled Carbon, Sulfur, and Nitrogen Cycles Mediated by Microorganisms in the Water Column of a Shallow-Water Hydrothermal Ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02718>
- Liu, J., Wang, Z., Belchik, S. M., Edwards, M. J., Liu, C., Kennedy, D. W., Merkley, E. D., Lipton, M. S., Butt, J. N., Richardson, D. J., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K., Rosso, K. M., & Shi, L. (2012). Identification and characterization of M to A: A decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. *Frontiers in Microbiology*, *3*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00037>
- López, D., Sepúlveda, M., & Vidal, G. (2016). *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus* in constructed wetlands: Development and nutrient uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *16*(3), 763–777.
- López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L. A., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldivar, R. (2019). Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Science of the Total Environment*, *690*, 1068–1088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.052>
- Luther, G. W., Findlay, A. J., MacDonald, D. J., Owings, S. M., Hanson, T. E., Beinart, R. A., & Girguis, P. R. (2011). Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: A look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Frontiers in Microbiology*, *2*(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00062>
- Ma, X., Song, X., Li, X., Fu, S., Li, M., & Liu, Y. (2018). Characterization of microbial communities in pilot-scale constructed wetlands with *salicornia* for treatment of marine aquaculture effluents. *Archaea*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/7819840>
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., De La Torre, J. R., & Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, *461*(7266), 976–979. <https://doi.org/10.1038/nature08465>
- Miao, L., Wang, C., Adyel, T. M., Zhao, J., Yan, N., Wu, J., & Hou, J. (2021). Periphytic Biofilm Formation on Natural and Artificial Substrates: Comparison of Microbial Compositions, Interactions, and Functions. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684903>

- Miglioranza, K. S. B., de Moreno, J. E. A., & Moreno, V. J. (2004). Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Soják from a shallow lake in Argentina. *Water Research*, *38*(7), 1765–1772. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.017>
- Paerl, H. (2017). The cyanobacterial nitrogen fixation paradox in natural waters. *F1000Research*, *6*.
- Quiroga-Flores, R., Guédron, S., & Achá, D. (2021). High methylmercury uptake by green algae in Lake Titicaca: Potential implications for remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *207*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111256>
- Rehman, K., Ijaz, A., Arslan, M., & Afzal, M. (2019). Floating treatment wetlands as biological buoyant filters for wastewater reclamation. En *International Journal of Phytoremediation* (Vol. 21, Número 13, pp. 1273–1289). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1633253>
- Ren, Z., Qu, X., Peng, W., Yu, Y., & Zhang, M. (2019). Nutrients drive the structures of bacterial communities in sediments and surface waters in the river-lake system of Poyang Lake. *Water (Switzerland)*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/w11050930>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584.
- Santschi, P., Höhener, P., Benoit, G., & Buchholtz-ten Brink, M. (1990). Chemical processes at the sediment-water interface. *Marine Chemistry*, *30*, 269–315. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(90\)90076-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90076-0)
- Sarret, G., Guédron, S., Acha, D., Bureau, S., Arnaud-Godet, F., Tisserand, D., Goni-Urriza, M., Gassie, C., Duwig, C., Proux, O., & Aucour, A. M. (2019). Extreme Arsenic Bioaccumulation Factor Variability in Lake Titicaca, Bolivia. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47183-8>
- Schlesinger, W., & Bernhardt, E. (2020). *Biogeochemical Cycling on Land* (pp. 183–248). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814608-8.00006-2>
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., & Luna-Guido, M. (2014). Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere*, *24*(3), 291–307. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3)
- Shahid, M. J., Arslan, M., Ali, S., Siddique, M., & Afzal, M. (2018). Floating Wetlands: A Sustainable Tool for Wastewater Treatment. En *Clean - Soil, Air, Water* (Vol. 46, Número 10). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/clen.201800120>
- South, K. A., Nordstedt, N. P., & Jones, M. L. (2021). Identification of plant growth promoting rhizobacteria that improve the performance of greenhouse-grown petunias under low fertility conditions. *Plants*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071410>

- Teixeira, S., Vieira, M. N., Marques, J. E., & Pereira, R. (2014). Bioremediation of an Iron-Rich Mine Effluent by *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, *16*(12), 1228–1240. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.821454>
- Vymazal, J. (2013). Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecological Engineering*, *61*, 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.023>
- Wang, Q., Wang, C., Yu, W. W., Turak, A., Chen, D., Huang, Y., Ao, J., Jiang, Y., & Huang, Z. (2018). Effects of nitrogen and phosphorus inputs on soil bacterial abundance, diversity, and community composition in chinese fir plantations. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01543>
- Wenzel, W. W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, *321*(1), 385–408. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9686-1>
- Whittenbury, R., & Dalton, H. (1981). The Methylophilic Bacteria. En M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, & H. G. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* (pp. 894–902). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_71
- Wu, S., Zhao, Y., Chen, Y., Dong, X., Wang, M., & Wang, G. (2019). Sulfur cycling in freshwater sediments: A cryptic driving force of iron deposition and phosphorus mobilization. *Science of The Total Environment*, *657*, 1294–1303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.161>
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. En *International Soil and Water Conservation Research* (Vol. 3, Número 4, pp. 316–323). International Research and Training Center on Erosion and Sedimentation and China Water and Power Press. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>

8. Anexos

Tabla S1. Medidas de diversidad Alpha y numero de Cobertura de Librería de Good para muestras de perifiton. Las muestras en gris son muestras que no pudieron colectadas por falta de perifiton

Muestra	Lecturas validas totales	Índice de Diversidad de Shannon	Cobertura de librería de Good (%)	Numero de UTOs	Numero de lecturas identificadas a nivel de especie	Número de especies encontradas	Porcentaje de CBAN
P11							
P12	32565	3.476	98.9	739	17701 (54.4%)	469	40.32
P13	17488	5.489	95.4	1581	8802 (50.3%)	907	15.09
P14	10390	5.502	93.9	1298	4694 (45.2%)	795	16.73
P15	10651	3.229	98.6	299	5738 (53.9%)	193	42.04
P16	33268	3.212	99.3	460	17837 (53.6%)	293	42.29
P17	43653	3.312	98.5	1218	14387 (33.0%)	788	25.11
P18	10126	5.867	91.7	1545	4498 (44.4%)	922	11.10
P19							
P21							
P22	19114	4.980	97.8	1080	8133 (42.5%)	631	17.89
P23	30003	3.548	98.7	855	12493 (41.6%)	529	30.31
P24	26760	3.114	98.6	668	9350 (34.9%)	423	27.51
P25							
P26							
P27	83206	3.289	99.0	1403	34672 (41.7%)	895	33.42
P28	17425	3.221	98.5	480	7606 (43.6%)	300	35.39
P29	67831	3.357	99.0	1212	32197 (47.5%)	769	37.48
P31							
P32	1616	4.725	85.0	378	834 (51.6%)	222	37.30
P33	56873	3.357	99.1	956	26930 (47.4%)	593	35.29
P34	75553	3.080	99.4	775	31621 (41.9%)	495	19.24
P35							
P36	16645	5.468	95.9	1515	8893 (53.4%)	918	14.61
P37	4577	5.443	91.2	768	2245 (49.0%)	425	15.84
P38	69212	4.760	98.5	2505	27635 (39.9%)	1552	16.88
P39							

Tabla S2. Medidas de diversidad Alpha y numero de Cobertura de Librería de Good para muestras de sedimento.

Muestra	Lecturas validas totales	índice de Diversidad de Shannon	Cobertura de librería de Good (%)	Numero de OTUs	Numero de lecturas identificadas a nivel de especie	Número de especies encontradas	Porcentaje de CBAN
S11	71794	6.736	96.7	5373	33836 (47.1%)	4267	15.84
S12	77892	6.800	96.9	5815	35591 (45.7%)	4578	16.89
S13	86955	5.512	98.5	3102	45991 (52.9%)	2294	15.97
S14	76690	6.781	96.7	5625	36664 (47.8%)	4417	9.22
S15	81793	7.252	96.5	6914	38903 (47.6%)	5400	10.54
S16	84479	3.783	98.2	2911	31115 (36.8%)	1922	24.52
S17	27749	2.918	99.4	364	10742 (38.7%)	248	36.34
S18	82709	2.971	99.3	994	28388 (34.3%)	623	28.64
S18	44585	2.896	99.6	416	17099 (38.4%)	297	36.31
S21	77808	6.425	97.3	4993	38533 (49.5%)	3897	19.39
S22	83293	6.467	97.5	4994	43389 (52.1%)	3873	19.17
S23	91414	6.930	97.4	6008	46799 (51.2%)	4613	13.80
S24	93455	6.884	97.8	5410	47783 (51.1%)	4119	13.49
S25	64086	2.919	99.6	536	24929 (38.9%)	359	36.47
S26	53251	2.923	99.5	552	20092 (37.7%)	360	35.27
S27	46419	7.160	95.8	4889	24025 (51.8%)	3733	14.32
S28	29829	7.237	94.3	4051	15272 (51.2%)	3079	11.49
S29	21437	7.296	91.5	4004	10711 (50.0%)	2600	10.17
S31	17559	6.619	93.1	2653	9794 (55.8%)	1668	16.34
S32	29059	5.260	96.5	2074	16442 (56.8%)	1294	28.46
S33	82343	6.909	97.0	5952	40903 (49.7%)	4588	12.88
S34	12617	6.596	90.7	2323	6509 (51.6%)	1377	15.04
S35	80399	2.692	99.7	619	23775 (29.6%)	413	27.40
S36	16744	2.932	99.1	323	6244 (37.3%)	221	34.62
S37	9327	6.591	84.3	2387	4892 (52.4%)	1404	8.22
S38	81171	2.932	99.7	576	31298 (38.6%)	388	35.81
S39	87822	7.101	97.5	5935	45995 (52.4%)	4561	10.77

Tabla S3. Concentración de ADN e indicadores de pureza (A260/A280 y A260/A230) para todas las muestras de sedimento y perifiton analizadas en este estudio. Guiones en los valores denotan muestras de perifiton que no pudieron ser colectadas.

Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
S11	17.410 ± 1.859	1.747 ± 0.152	0.705 ± 0.037	P11	-	-	-
S12	11.678 ± 1.508	1.736 ± 0.024	0.252 ± 0.013	P12	275.103 ± 4.151	1.907 ± 0.008	2.206 ± 0.013
S13	6.519 ± 0.875	1.745 ± 0.143	0.315 ± 0.072	P13	209.424 ± 11.427	1.934 ± 0.009	2.176 ± 0.024
S14	9.203 ± 1.857	1.558 ± 0.107	0.754 ± 0.013	P14	86.729 ± 15.126	1.883 ± 0.026	2.219 ± 0.008
S15	9.286 ± 1.596	1.912 ± 0.219	0.081 ± 0.068	P15	59.966 ± 7.283	1.843 ± 0.016	1.916 ± 0.041
S16	5.961 ± 0.107	1.927 ± 0.086	0.748 ± 0.508	P16	8.154 ± 5.596	2.196 ± 0.681	1.680 ± 0.159
S17	9.331 ± 0.688	1.655 ± 0.176	0.219 ± 0.086	P17	32.798 ± 4.456	1.931 ± 0.012	1.860 ± 0.064
S18	8.638 ± 1.160	1.825 ± 0.182	0.028 ± 0.108	P18	92.377 ± 0.550	1.870 ± 0.023	2.034 ± 0.019
S19	10.368 ± 0.488	1.649 ± 0.031	0.212 ± 0.080	P19	-	-	-
S21	11.892 ± 0.404	1.531 ± 0.019	0.128 ± 0.080	P21	-	-	-
S22	10.400 ± 0.833	1.660 ± 0.088	0.137 ± 0.017	P22	178.288 ± 2.354	1.900 ± 0.004	1.976 ± 0.023
S23	8.517 ± 0.372	1.580 ± 0.064	0.078 ± 0.771	P23	174.140 ± 1.168	1.855 ± 0.013	2.068 ± 0.012
S24	9.181 ± 2.213	1.515 ± 0.067	0.075 ± 0.027	P24	112.899 ± 3.703	1.878 ± 0.004	2.049 ± 0.050
S25	8.775 ± 0.729	1.671 ± 0.177	0.036 ± 0.319	P25	-	-	-
S26	8.530 ± 0.689	1.664 ± 0.056	0.071 ± 0.103	P26	-	-	-
S27	3.758 ± 0.168	1.322 ± 0.197	0.338 ± 0.026	P27	180.05 ± 5.107	1.916 ± 0.010	2.144 ± 0.019
S38	6.483 ± 0.239	1.453 ± 0.085	0.125 ± 0.179	P38	82.465 ± 1.433	1.861 ± 0.006	2.109 ± 0.037
S29	0.747 ± 0.166	1.492 ± 0.799	0.025 ± 0.131	P29	55.116 ± 3.594	1.827 ± 0.050	2.069 ± 0.044
S31	11.083 ± 1.799	1.919 ± 0.082	1.235 ± 0.016	P31	-	-	-
S32	34.393 ± 2.315	1.859 ± 0.012	0.769 ± 0.013	P32	190.078 ± 2.194	1.895 ± 0.013	2.146 ± 0.018
S33	9.269 ± 0.837	2.271 ± 0.631	0.049 ± 0.005	P33	154.955 ± 3.064	1.780 ± 0.034	1.873 ± 0.079
S34	20.404 ± 1.192	1.884 ± 0.014	1.211 ± 0.025	P34	151.247 ± 6.167	1.862 ± 0.015	2.001 ± 0.094
S35	2.107 ± 0.563	2.385 ± 0.266	0.610 ± 0.018	P35	-	-	-
S36	3.646 ± 0.443	1.695 ± 0.330	0.459 ± 0.255	P36	293.236 ± 4.132	1.892 ± 0.008	2.193 ± 0.046
S37	2.096 ± 0.365	1.306 ± 0.188	-0.459 ± 0.059	P37	87.734 ± 1.359	1.894 ± 0.010	1.850 ± 0.035
S38	4.665 ± 0.678	2.196 ± 0.082	0.541 ± 0.008	P38	58.893 ± 1.389	1.340 ± 0.011	2.078 ± 0.041
S39	3.032 ± 1.727	2.109 ± 0.162	0.641 ± 0.060	P39	-	-	-

Tabla S4. Resultados ANOVA de permutación de modelos para ambos tipos de muestra. Los asteriscos denotan valores significativos (< 0,05) de p.

Sedimentos					Perifiton				
	Df	ChiSquare	F	Pr(>F)		Df	ChiSquare	F	Pr(>F)
Modelo	4	0.55993	2.2534	0.0049*	Modelo	4	0.36043	0.7056	0.7587
Residuales	22	1.36666			Residuales	13	1.66017		

Tabla S5. Resultados de la regresión lineal entre los géneros seleccionados gráficamente a partir de la Figura 4. El efecto significativo de las concentraciones de nutrientes (nitritos y fosfatos) sobre la abundancia relativa de los géneros analizados ($p < 0,05$) se indica con un asterisco.

Genero	Nitritos		Fosfatos	
	R ²	p	R ²	p
Acinetobacter	0.090	0.069	0.478	< 0.001*
Arcobacter	-0.005	0.361	0.116	< 0.05*
Aurantimonas	0.355	< 0.001*	0.147	< 0.05*
Beggiatoa	0.481	< 0.001*	0.109	0.051
Caballeronia	0.499	< 0.001*	0.261	< 0.01*
Chromobacterium	0.495	< 0.001*	0.131	< 0.05*
Deefgea	-0.040	0.947	0.370	< 0.001*
Desulfarculus	0.142	< 0.05*	0.007	0.285
Desulfobacca	0.542	< 0.001*	0.204	< 0.05*
Desulfobacula	0.227	< 0.01*	0.096	0.063
Dokdonella	-0.020	0.501	0.201	< 0.05*
Ferribacterium	0.215	< 0.01*	0.623	< 0.001*
Marinobacter	-0.026	0.560	0.162	< 0.05*
Methylibium	0.039	0.855	0.516	< 0.001*
Methyloprofundus	-0.033	0.684	0.390	< 0.001*
Oceanicoccus	-0.020	0.486	0.154	< 0.05*
Rhodomicrobium	0.842	< 0.001*	0.321	< 0.01*
Sideroxydans	0.601	< 0.001*	0.256	< 0.01*
Sphaerotilus	0.004	0.306	0.745	< 0.001*
Sulfitobacter	0.354	< 0.001*	0.023	0.216
Thiomonas	-0.039	0.889	0.369	< 0.001*
Tistrella	-0.035	0.731	0.351	< 0.001*



Figura S1. Ejemplo de un mesocosmos que conforma el sistema de fitorremediación con plantines de *S. californicus* en proceso de aclimatación. En la esquina inferior derecha se incluye una foto del tanque de suministro de nutrientes (M0).

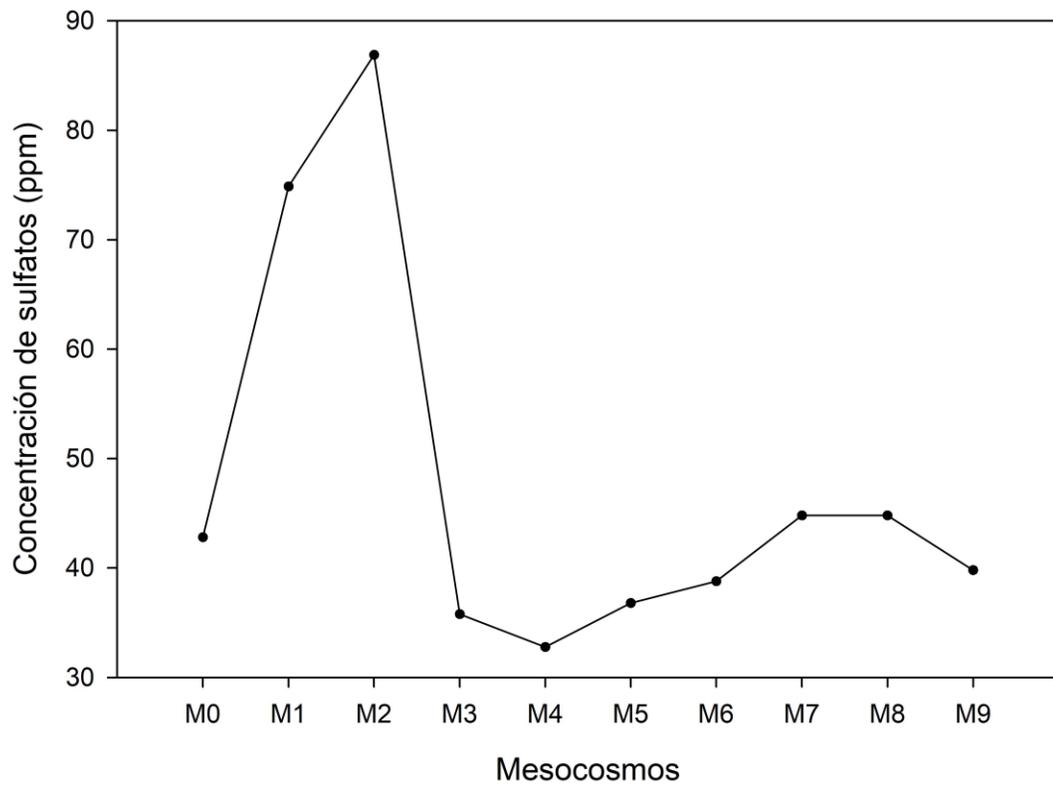


Figura S2. Concentraciones de sulfato a lo largo del sistema de mesocosmos. Medidos en el 14 de Agosto de 2021.

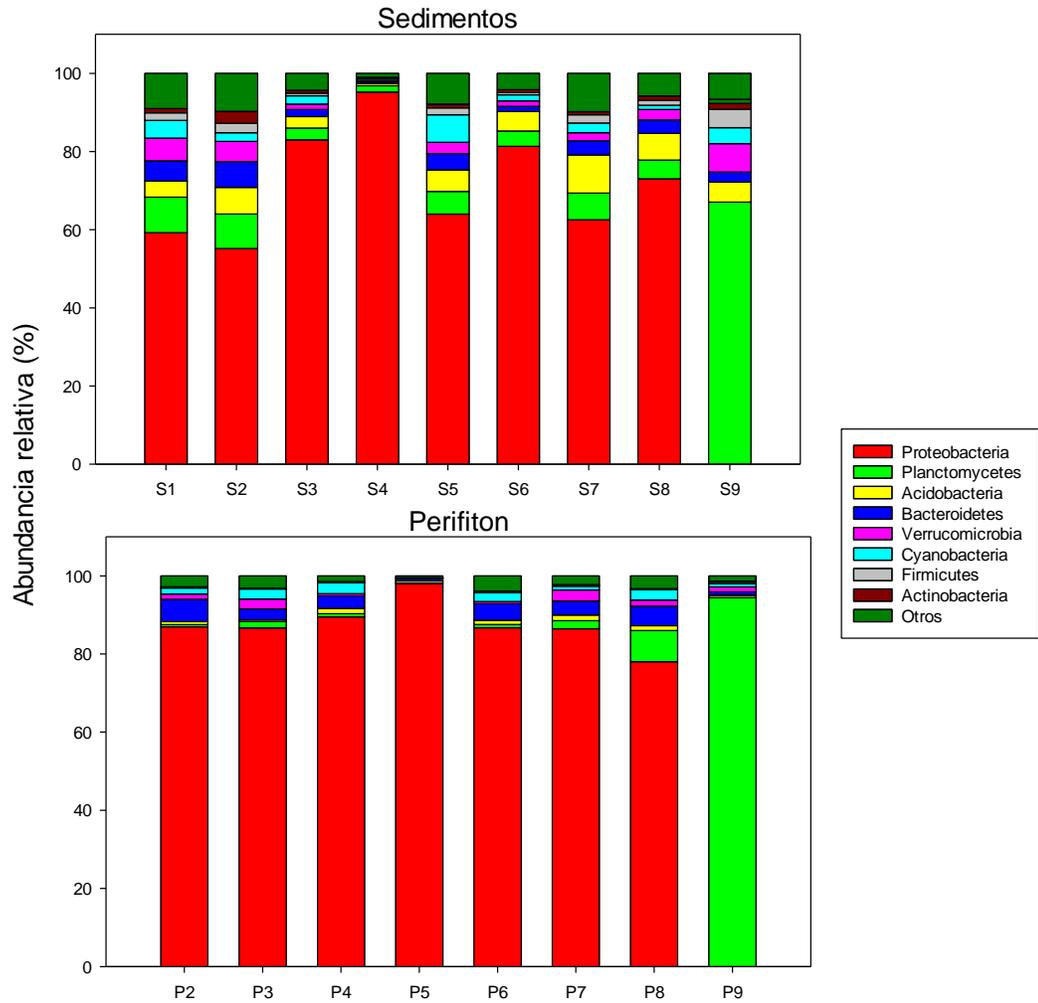


Figura S3. Abundancias relativas promediadas de los filos más abundantes por mesocosmos para muestras de sedimento (arriba) y perifiton (abajo).

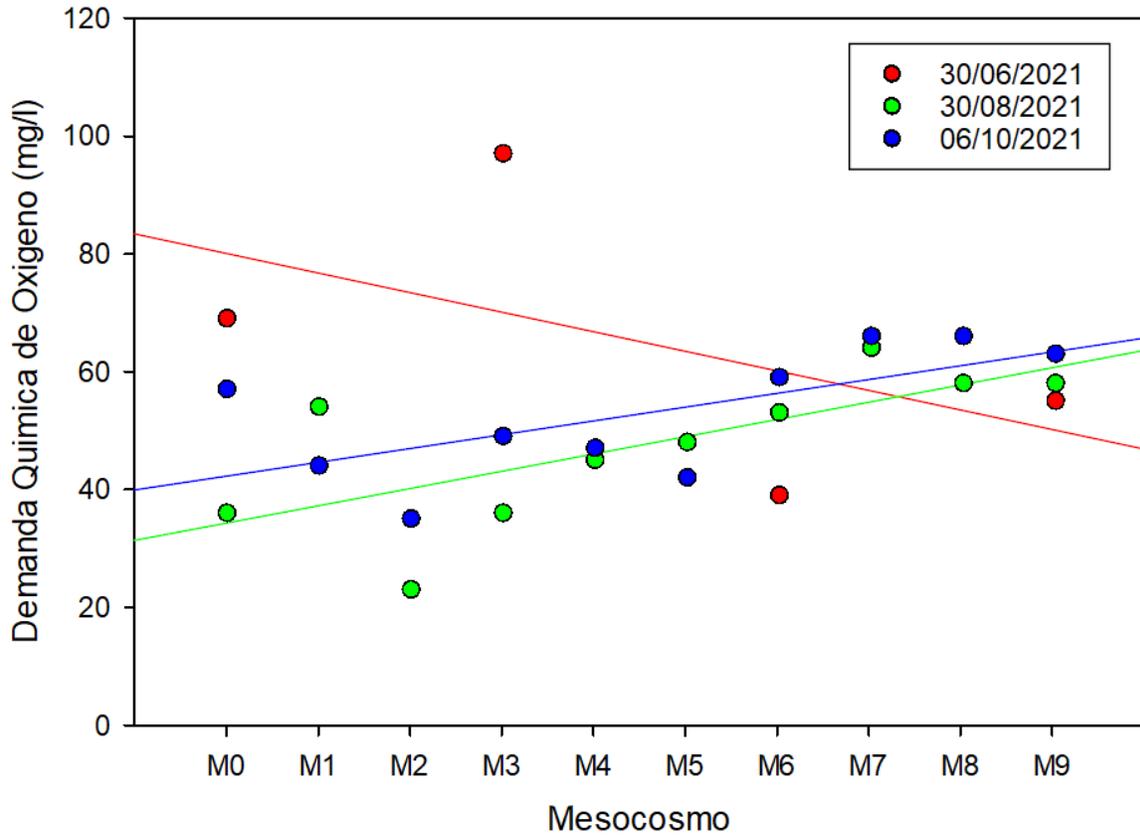


Figura S4. Demanda química de oxígeno (DQO) en los mesocosmos del Sistema medido en tres fechas distintas. La primera fecha (30/06/2021) solo tiene 4 mediciones de DQO en los mesocosmos M0, M3, M6 y M9.