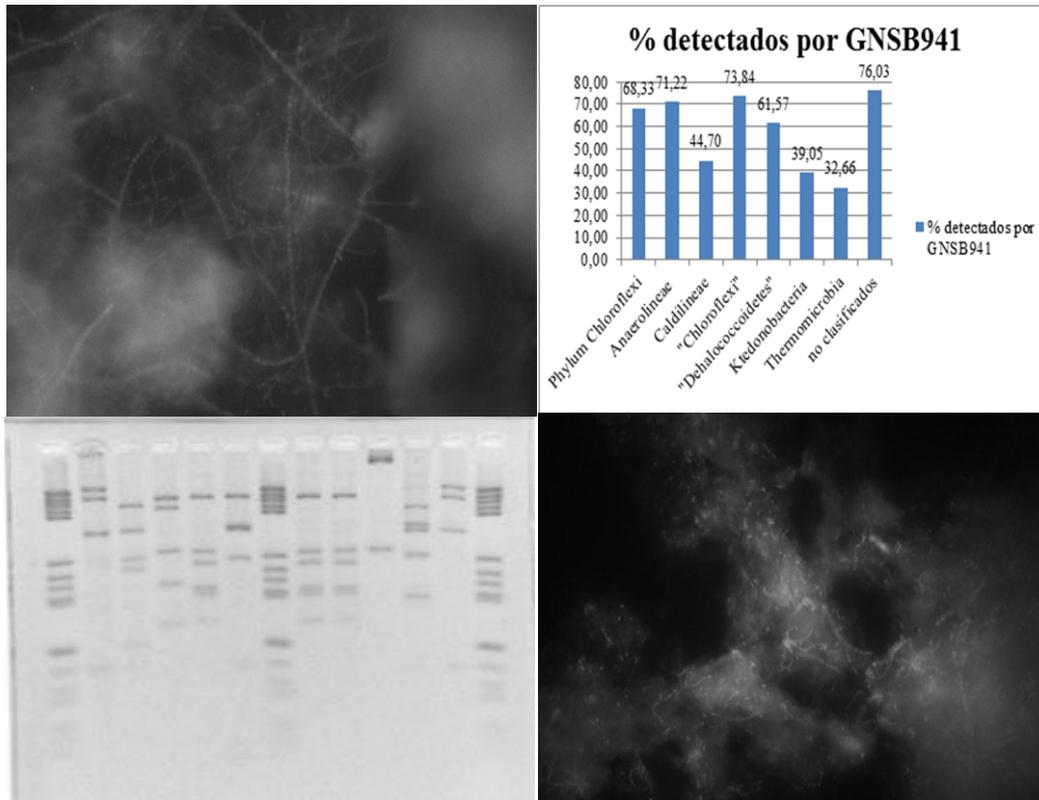


*“Enriquecimiento de organismos del filo  
Chloroflexi a partir de biomasa de reactores de  
tratamiento de aguas residuales”*



*Ana María Cantera Fonseca*

*Trabajo especial II*

*Licenciatura de Bioquímica*

*Tutora: Dra. Claudia Etchebere*

*Laboratorio de Ecología Microbiana*

*Cátedra de Microbiología*

*Facultad de Ciencias/Facultad de Química/IIBCE*

*DICIEMBRE 2016*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por soltar mis alas y ayudarme en el vuelo. A mi madre por cuidar de mis hijas para poder estudiar, por su apoyo y su ayuda.

A mi hermana por motivarme y apuntalarme en la vida, y por ser incondicional.

A Claudia por su paciencia, por su motivación, por compartir sus conocimientos y sobre todo por su dedicación.

A las gente de micro en especial a la gente del tercero; Ana, Silvana, Javier, Lucia, Jimena, Guadalupe, Dayana, Ángela e Inés por compartir sus conocimientos, por las risas, la música, los buenos momento y por esos almuerzos inolvidables. A Patricia por su guía, apoyo y su simpatía inquebrantable.

A mis hijas, por la motivación que me dieron para terminar mi carrera, por su amor, por su comprensión y el tiempo que me dieron para escribir.

A mis amigas por ser incondicionales, por su apoyo, por sus conocimientos, por siempre estar presentes, y fundamentalmente por ser mis amigas.

A mis compañeras y compañeros de trabajo por su impulso, apoyo y sobre todo su “aguante” en los malos momentos. A esos malos momentos por hacerme más fuerte para seguir adelante.

A todos, muchas, muchas gracias!!!!!!

## RESUMEN

Los organismos del filo *Chloroflexi* (OFC) que pertenecen al Dominio Bacteria, presentan una gran proporción de organismos “no cultivables”. En las bases de datos de secuencias existen un gran número de secuencias de microorganismos de este filo provenientes de clones ambientales y solo unas pocas secuencias que corresponden a representantes cultivados. Metabólicamente es un grupo muy diverso y está distribuido en una gran variedad de hábitat como: fuentes termales, agua dulce, ambientes marinos e hipersalinos, suelos, y sistemas de tratamiento de aguas residuales, entre otros. Particularmente organismos de este filo pertenecientes a las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae*, han sido frecuentemente detectados en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Aunque se desconoce su función se postula que puedan tener un papel importante ya que las variaciones en su proporción frente al resto de los microorganismos, se corresponden con problemas en el funcionamiento de estos sistemas de tratamientos de efluentes.

Organismos de este filo, fueron detectados por el equipo de trabajo de la Dra. C. Etchebere estudiando muestras de lodos de sistemas de tratamiento de aguas residuales, tanto a escala real como de laboratorio. Se detectó una gran proporción de estos microorganismos en muestras de un reactor metanogénico a escala real que presentaba el fenómeno de “bulking” (sobrecrecimiento de bacterias filamentosas).

El objetivo de este trabajo fue generar conocimiento que permita explicar el rol de estos organismos en sistemas de tratamiento de efluentes y diseñar un método de análisis de la comunidad de OFC en muestras ambientales.

Se buscó enriquecer estos organismos a partir de lodos de un reactor desnitrificante utilizando diferentes sustratos. Se postula que los OFC están especializados en la degradación de varios polisacáridos a monosacáridos por la acción de varias exo-enzimas. Por esta razón en este trabajo se propuso el estudio y enriquecimiento de los OFC en sustratos como extracto de levadura y extracto celular de la biomasa del reactor sometida al tratamiento por autoclave, así como de N-acetilglicosamina (NAG), que es un componente de la pared celular de peptidoglicano. Como estos organismos se detectaron en reactores anaerobios y también desnitrificantes, se planteó estas dos condiciones para los enriquecimientos.

Si bien se observó un aumento en el número de filamentos en los cultivos durante el tiempo de incubación, este aumento fue muy escaso. La técnica de *FISH* empleada para la

cuantificación resulto ser muy engorrosa debido a que como son filamentos y en general se ubican dentro de acúmulos, no es posible una buena cuantificación.

Para conocer cuáles eran los organismos del filo presentes en diferentes sistemas, se analizaron las comunidades bacterianas de tres bibliotecas de clones del gen ARNr de 16S obtenidas con anterioridad. Estas bibliotecas fueron construidas a partir de muestras tomadas de enriquecimientos anaerobios en diferentes condiciones (acetato/nitrato, acetato/antraquinona-2,6-disulfonato, acetato/tricloroetano). En las tres bibliotecas analizadas, se encontró una única secuencia que se afilió al filo *Chloroflexi* en el de acetato/nitrato. Para el análisis de dicha biblioteca se realizó una selección previa con enzimas de restricción y se secuenciaron representantes de los diferentes perfiles detectados.

Para poder comparar los organismos del filo encontrados en los diferentes reactores estudiados, se realizó estudios filogenéticos con todas las secuencias obtenidas previamente y secuencias obtenidas de banco de datos (RDP y NCBI). Las secuencias de los clones de los reactores estudiados mayoritariamente se agruparon dentro de la familia *Anaerolineaceae* pero con bajos valores de umbral de confianza. Solamente se obtuvo un alto valor de umbral de confianza en la clasificación para la secuencia del clon AO6 Bader que fue la única que se ubicó dentro de la familia *Caldilineaceae* en el género *Caldilinea*.

Se estudió la aplicación de la técnica de T-RFLP específica para el filo, para el análisis de las comunidades de OFC de los reactores. Se determinó que con la enzima *Msp* I se logra diferenciar entre las secuencias de los organismos de las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae* que son los OFC que mayoritariamente se recuperan de los reactores. Basados en estos estudios se propone un método de T-RFLP para estudiar la diversidad de los OFC en reactores de tratamiento de aguas residuales.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>1.1- El filo <i>Chloroflexi</i></b> .....	14
<b>1.2- Sistemas de tratamientos de efluentes</b> .....	19
Biorreactores de tratamientos de efluentes.....	24
Reactores UASB.....	26
Reactores SBR.....	28
<b>1.3- Sistemas desnitrificantes</b> .....	29
<b>1.4- Bases de las técnicas moleculares utilizadas en este trabajo</b> .....	30
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente: <i>FISH</i> .....	30
Polimorfismos del largo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP).....	31
<b>1.5- Antecedentes del trabajo</b> .....	32
<b>2.- OBJETIVO GENERAL</b> .....	34
<b>3.- ESTRATEGIA</b> .....	35
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
<b>4.1 Enriquecimientos</b> .....	37
Enriquecimientos realizados .....	37
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente ( <i>FISH</i> ).....	42
Extracción de ADN.....	43
<b>4.2 Análisis de secuencias del gen ARNr 16S de OFC obtenidas de enriquecimientos previos</b> .....	44
Análisis de bibliotecas de genes ARNr 16S (placas N1, D1, y T1).....	44

Análisis filogenéticos de secuencias del gen ARNr 16S de <i>Chloroflexi</i> obtenidas en trabajos previos.....	46
Análisis bioinformáticos: Estudio de cobertura de sondas, cebadores (primers) y de enzimas de restricción para diferenciar el filo.....	47
<b>5.- RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Enriquecimientos realizados .....</b>	<b>49</b>
Observación macroscópica.....	49
Resultados obtenidos por la técnica de <i>FISH</i> .....	59
Discusión.....	62
<b>5.2 Análisis de secuencias de bibliotecas obtenidas de enriquecimientos previos .....</b>	<b>66</b>
Bibliotecas de clones de las placas N1, D1 y T1 .....	66
Discusión.....	69
<b>5.3 Análisis filogenéticos de secuencias del filo <i>Chloroflexi</i>.....</b>	<b>76</b>
Árboles filogenéticos.....	76
<b>5.4 Análisis bioinformáticos.....</b>	<b>81</b>
Estudio de coberturas de diferentes sondas para el diseño de un T-RFLP específico para el filo <i>Chloroflexi</i> .....	81
Discusión.....	86
Estudio de enzimas de restricción .....	86
Discusión.....	92
<b>6.-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>6.1 Enriquecimientos.....</b>	<b>96</b>
Extracto celular como sustrato.....	96
NAG como sustrato .....	97
<b>6.2 Análisis de secuencias de biblioteca de clones obtenidas en trabajos previos .....</b>	<b>98</b>
<b>6.3 Análisis de las secuencias obtenidas previamente .....</b>	<b>99</b>

<b>6.4 Métodos para analizar la abundancia y diversidad de OFC en muestras ambientales.....</b>	<b>99</b>
<i>FISH</i> .....	<b>99</b>
T-RFLP.....	<b>100</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>101</b>
<b>8.- ANEXOS.....</b>	<b>116</b>
Anexo 1 - Enriquecimientos.....	<b>116</b>
Anexo 2 - Biblioteca de clones.....	<b>132</b>
Anexo 3 - Análisis Bioinformáticos.....	<b>135</b>
Anexo 4 - Protocolo de extracción de ADN.....	<b>148</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Representación esquemática de la formación de cápsulas y agregación microbiana en la formación de flóculos y biofilms. ....	<b>20</b>
<b>Fig. 2.</b> Esquema del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica a partir de proteínas, polisacáridos y lípidos.....	<b>22</b>
<b>Fig. 3.</b> Esquema de un reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodo (UASB).....	<b>27</b>
<b>Fig. 4.</b> Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR nitrificante-desnitrificante.....	<b>29</b>
<b>Fig. 5.</b> Esquema de la metodología llevada a cabo en la técnica de FISH.....	<b>31</b>
<b>Fig. 6.</b> Esquema del protocolo para T-RFLP.....	<b>31</b>
<b>Fig. 7.</b> Diagrama de los enriquecimientos realizados los diferentes lodos utilizados.....	<b>38</b>
<b>Fig. 8.</b> Curva de calibración para la determinación espectrofotométrica de la concentración de NAG con DNS.....	<b>55</b>
<b>Fig. 9.</b> Microfotografía de una muestra tomada del enriquecimiento 12 con medio de cultivo suplementado con Extracto Celular y $\text{NO}_3^-$ a los 65 días de incubación.....	<b>60</b>
<b>Fig. 10.</b> Microfotografía de una muestra de lodo de entrada al reactor del 11.12.2005. <b>60</b>	
<b>Fig. 11.</b> Árbol filogenético construido con la herramienta TREE BUILDER del RDP con las secuencias de las placas N1, D1, y T1, junto con secuencias recuperadas con la herramienta SEQMATCH de la base de datos del RDP.....	<b>75</b>
<b>Fig. 12.</b> Árbol filogenético de las secuencias de los clones con el inserto del principio del gen ARNr 16S.....	<b>79</b>
<b>Fig. 13.</b> Árbol filogenético de las secuencias de los clones con el inserto del final del gen ARNr 16S.....	<b>80</b>
<b>Fig. 14a.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> GNSB941.....	<b>83</b>
<b>Fig. 14b.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda GNSB941.....	<b>83</b>
<b>Fig. 15a.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> CFX1223.....	<b>84</b>
<b>Fig. 15b.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda CFX1223.....	<b>84</b>
<b>Fig 16a.</b> Observación macroscópica de los viales 7 al 12 en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 268 días de incubación.....	<b>131</b>

<b>Fig. 16b.</b> Observación macroscópica de los viales subcultivados 7' al 12', en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 268 días de incubación.....	<b>131</b>
<b>Fig. 16c.</b> Observación macroscópica de los viales A1 al A6, en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 49 días de incubación.....	<b>131</b>
<b>Fig. 16d.</b> Fotografía de los cultivos de los enriquecimientos en estufa a 30 °C.....	<b>131</b>
<b>Fig. 17.</b> Fotografía de una corrida electroforética de uno de los geles de los productos de amplificación por PCR, de las secuencias de los clones indicados de la placa N1.....	<b>133</b>
<b>Fig. 18.</b> Fotografía de una corrida electroforética con diferentes perfiles de restricción (ARDRA) de secuencias de la placa N1.....	<b>133</b>
<b>Fig. 19.</b> Análisis de los geles de ARDRA de la placa N1 con el programa GelCompar.....	<b>134</b>
<b>Fig. 20a.</b> Porcentajes de secuencias de OFC detectados por la sonda CFX1A311.....	<b>137</b>
<b>Fig. 20b.</b> Porcentajes de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda CFX1A311.....	<b>138</b>
<b>Fig. 21a.</b> Porcentajes de secuencias de OFC detectados por la sonda CFX784.....	<b>139</b>
<b>Fig. 21b.</b> Porcentajes de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda CFX784.....	<b>140</b>
<b>Fig. 22.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC detectados por la sonda CFX197.....	<b>131</b>
<b>Fig. 23a.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC detectados por la sonda GNSB633.....	<b>142</b>
<b>Fig. 23b.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda GNSB633.....	<b>143</b>
<b>Fig. 24a.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC detectados por la sonda CFX109.....	<b>144</b>
<b>Fig. 24b.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda CFX109.....	<b>145</b>
<b>Fig. 25a.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC detectados por la sonda Dhe1259t... <b>146</b>	
<b>Fig. 25b.</b> Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda Dhe1259t. ....	<b>147</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de los diferentes subfilos del filo <i>Chloroflexi</i> ...	15
<b>Tabla 2.</b> Tipos de reactores anaerobios según el estado en que se encuentre la masa, suspendida o inmovilizada.....	26
<b>Tabla 3.</b> Esquema de los enriquecimientos de Extracto de Levadura y Extracto Celular.....	39
<b>Tabla 4.</b> Esquema de los blancos realizados. ....	39
<b>Tabla 5a.</b> Esquema de los enriquecimientos con NAG y los diferentes inóculos de lodos utilizados.....	40
<b>Tabla 5b.</b> Esquema de los blancos realizados en los enriquecimientos con NAG como sustrato.....	41
<b>Tabla 6.</b> Clasificación subjetiva de los acúmulos según Eikelboom, dependiendo de la cantidad de filamentos observados en ellos .....	43
<b>Tabla 7.</b> Esquema de los tres enriquecimientos previos de nitrato, AQDS-Antraquinona-2,6-disulfonato, TCE-Tricloroetano con los que se construyeron las librerías de las placas de clones de los genes ARNr 16S. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Cuadro con los clones obtenidos previamente de reactores UASB desnitrificantes a escala de laboratorio, que contenían secuencias del filo <i>Chloroflexi</i> . ....	46
<b>Tabla 9.</b> Esquema de las sondas analizadas.....	47
<b>Tabla 10.</b> Enzimas de restricción con sus sitios de reconocimiento y puntos de corte..	48
<b>Tabla 11.</b> Resumen de las observaciones macroscópicas y por FISH de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato en presencia y ausencia de nitrito como aceptor de electrones.....	50
<b>Tabla 12a.</b> Resumen de las observaciones macroscópicas y por <i>FISH</i> de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato.....	51
<b>Tabla 12b.</b> Resumen de las observaciones macroscópicas y por FISH de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato y nitrito como aceptor de electrones.....	52
<b>Tabla 13a.</b> Resumen de las observaciones macroscópicas y por FISH de los enriquecimientos con NAG como sustrato.....	53
<b>Tabla 13b.</b> Resumen de las observaciones macroscópicas y por FISH de los enriquecimientos con NAG como sustrato y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como aceptor de electrones	54

<b>Tabla 14.</b> Medidas de las absorbancias de las soluciones de NAG de concentración conocida, para la construcción de la curva de calibración.....	<b>55</b>
<b>Tabla 15.</b> Comparación de las concentraciones de NAG en los blancos.....	<b>57</b>
<b>Tabla 16.</b> Observación microscópica de blancos de NAG con diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación.....	<b>58</b>
<b>Tabla 17.</b> Blancos de NAG de diferentes concentraciones en presencia y ausencia de $\text{NO}_3^-$ .....	<b>59</b>
<b>Tabla 18a.</b> Cuantificación de OFC detectados por el método de FISH utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941 en los viales con indicadores con Extracto Celular y con $\text{NO}_3^-$ .....	<b>61</b>
<b>Tabla 18b.</b> Cuantificación de OFC detectados por el método de FISH utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941 en los viales con indicadores con Extracto Celular y con $\text{NO}_3^-$ .....	<b>61</b>
<b>Tabla 18c.</b> Cuantificación de OFC detectados por el método de FISH utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941 en los viales subcultivados 7' con Extracto Celular y sin $\text{NO}_3^-$ .....	<b>61</b>
<b>Tabla 19.</b> Esquema de los clones elegidos al azar las placas D1 y T1 cuyos insertos fueron secuenciados.....	<b>67</b>
<b>Tabla 20.</b> Esquema de los clones secuenciados de la placa N1 con inserto de 1500 pb.....	<b>67</b>
<b>Tabla 21a.</b> Familias y géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones obtenidos a partir de la <b>placa N1</b> .....	<b>68</b>
<b>Tabla 21b.</b> Géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones analizados obtenidos a partir de la <b>placa D1</b> .....	<b>68</b>
<b>Tabla 21c.</b> Géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones analizados obtenidos a partir de la <b>placa T1</b> .....	<b>69</b>
<b>Tabla 22.</b> Esquema con los resultados obtenidos con la herramienta CLASSIFIER del RDP para las secuencias de los clones con el inserto del principio del gen ARNr 16S.....	<b>77</b>
<b>Tabla 23.</b> Esquema con los resultados obtenidos con la herramienta CLASSIFIER del RDP para las secuencias de los clones con el inserto del final del gen ARNr 16S.....	<b>78</b>
<b>Tabla 24a.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos detectados por las diferentes sondas.....	<b>85</b>

<b>Tabla 24b.</b> Porcentajes de secuencias de microorganismos aislados detectados por las diferentes sondas.....	<b>85</b>
<b>Tabla 25a.</b> Tamaño en pares de bases del fragmento terminal obtenido por el tratamiento “in sílico” de las <b>secuencias completas</b> de los OFC (donde las diferentes clases se diferencian por colores) con las enzimas de restricción <i>Msp</i> I, <i>Taq</i> I y <i>Hha</i> I.....	<b>89</b>
<b>Tabla 25b.</b> Tamaño de los fragmentos obtenidos por el tratamiento “in sílico” de las <b>secuencias parciales</b> de los OFC detallados (donde las diferentes clases se diferencian por colores) utilizando las enzimas de restricción <i>Msp</i> I, <i>Taq</i> I y <i>Hha</i> I. ....	<b>90</b>
<b>Tabla 26a.</b> Observaciones macroscópicas de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato.....	<b>118</b>
<b>Tabla 26b.</b> Observaciones macroscópicas de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como aceptor de electrones.....	<b>118</b>
<b>Tabla 27a.</b> Observación macroscópica de los enriquecimientos de Extracto Celular viales 7 al 9.....	<b>119</b>
<b>Tabla 27b.</b> Observación macroscópica de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como aceptor de electrones (viales 10 al 12). ....	<b>121</b>
<b>Tabla 27c.</b> Observación macroscópica de los enriquecimientos del 7´al 9´con Extracto Celular como sustrato, que fueron subcultivados de los viales 7 al 9 originales (cuando esto últimos tenían 125 días de incubación). Se indica con una X cuando fueron alimentadas en el casillero correspondiente. ....	<b>123</b>
<b>Tabla 27d.</b> Observación macroscópica de los enriquecimientos 10´al 12´ subcultivados de los viales 10 al 12 originales (cuando éstos últimos tenían 125 días de incubación) con Extracto Celular como sustrato y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> como aceptor de electrones. ....	<b>124</b>
<b>Tabla 27e.</b> Observación de los blancos de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato.....	<b>125</b>
<b>Tabla 28a.</b> Medida de las absorbancias en los diferentes enriquecimientos de NAG, cálculo de las respectivas concentraciones de NAG en µg/mL extrapoladas de la curva de calibración de la fig. 3. ....	<b>126</b>
<b>Tabla 28b.</b> Esquema de las observaciones macroscópicas realizadas en los viales con NAG como sustrato.....	<b>127</b>

<b>Tabla 28c.</b> Esquema de las observaciones macroscópicas realizadas en los viales con NAG como sustrato y con $\text{NO}_3^-$ como aceptor de electrones. ....	<b>128</b>
<b>Tabla 28d.</b> Esquema que detalla las muestras que se fijaron para <i>FISH</i> y las que se extrajeron para ADN, donde se indican los días de incubación que tenían los enriquecimientos respectivos al momento de realizarlas. ....	<b>129</b>
<b>Tabla 28e.</b> Medidas de las concentraciones de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ por HPLC en los enriquecimientos y subcultivos de NAG con 54 días de incubación para los viales A y C y 20 días de incubación para los viales B. ....	<b>130</b>
<b>Tabla 29a.</b> Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de los OFC detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> <b>GNSB941</b> . ....	<b>136</b>
<b>Tabla 29b.</b> Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> <b>GNSB941</b> . ....	<b>136</b>
<b>Tabla 30a.</b> Detalle de la cantidad y porcentaje de las secuencias de OFC detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> <b>CFX1223</b> . ....	<b>136</b>
<b>Tabla 30b.</b> Detalle de la cantidad y porcentaje secuencias de OFC aislados detectados por la sonda del filo <i>Chloroflexi</i> <b>CFX1223</b> . ....	<b>136</b>

# 1. Introducción

En esta introducción se pretende hacer una reseña bibliográfica de los organismos del filo *Chloroflexi* (OFC) y su rol en los sistemas de tratamiento de efluentes. Para esto se realizará una descripción de las características de los OFC, luego se describirán los sistemas de tratamiento de efluentes aerobios y anaerobios. Se describirá brevemente los reactores más frecuentemente utilizados así como los reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket-reactores de flujo ascendente con lecho de lodos) y SBR (Sequential Batch Reactors-reactores discontinuos secuenciales) estudiados en este trabajo. Por último se describirán las bases de la técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (*FISH*), método de biología molecular utilizado.

## 1.1 El filo *Chloroflexi*

El filo *Chloroflexi*, antiguamente conocido como bacterias verdes no sulfurosas (GNSB), contiene unos pocos representantes cultivables. Sin embargo, en las bases de datos de secuencias, hay un gran número de secuencias asignadas a este grupo. Metabólicamente es un grupo muy diverso y distribuido en una gran variedad de hábitat, como fuentes termales, suelos, agua dulce, ambientes marinos e hipersalinos, así como en sistemas de tratamientos de efluentes (Yamada *et al.*, 2005, Yamada y Sekiguchi, 2009).

Este filo, originalmente definido en 4 subfilos contiene varios microorganismos distribuidos hasta el momento en 8 clases diferentes que son; *Anaerolineae*, *Caldilineae*, *Dehalococcoidia*, *Chloroflexia*, *Ktedonobacteria*, *Thermomicrobia*, *Ardenticatenia* y la clase *Thrmoflexia* propuesta en 2014 (tabla 1).

En la clasificación primaria de Hugenholtz *et al.* (1998), las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae*, se agrupaban dentro del subfilo I, la clase *Dehalococcoidia* (denominada informalmente como “*Dehalococcoidetes*”) dentro del subfilo II, *Chloroflexia* (denominada como “*Chloroflexi*”) dentro del subfilo III y los clones ambientales agrupados dentro del cluster SAR202 en el subfilo IV.

**Tabla 1.** Esquema de los diferentes subfilos del filo *Chloroflexi*, según: (1) Sekiguchi *et al.*, 2003, (2) Yamada *et al.*, 2006, (3) Podosokorskaya *et al.*, 2013, (4) Nunoura *et al.*, 2013, (5) Imachi *et al.*, 2014, (6) Yamada *et al.*, 2007, (7) Gregoire *et al.*, 2011b, (8) Sun *et al.*, 2015, (9) Gregoire *et al.*, 2011a, (10) Kale *et al.*, 2013, (11) Löffler *et al.*, 2013, (12) Moe *et al.*, 2009, (13) Bowman *et al.*, 2013, (14) Pierson y Castenholz, 1974, (15) Hanada *et al.*, 1995, (16) Keppen *et al.*, 2000, (17) Gorlenko y Lokk, 1979, (18) Hanada *et al.*, 2002, (19) Pierson *et al.*, 1985, (20) Cole, *et al.*, 2013, (21) Holt y Lewin, 1968, (22) Lewin, 1970, (23) Morris *et al.*, 2004, (24) Jackson *et al.*, 1973, (25) King y King, 2014a, (26) Houghton, *et al.*, 2015, (27) Hugenholtz y Stackebrandt, 2004, (28) Botero *et al.*, 2004, (29) Sorokin *et al.*, 2012, (30) Chang *et al.*, 2011, (31) Yabe *et al.*, 2010, (32) Yabe *et al.*, 2016, (33) Yabe *et al.*, 2011, (34) King y King 2014b, (35) Kawaichi *et al.*, 2013, (36) Dodsworth, *et al.*, 2014, (37), Gupta *et al.*, 2013. Se indica el número asignado a las cepas tipo de cada especie.

SUB FILO	CLASE	ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE		
I	<i>Anaerolineae</i>	<i>Araerolineales</i>	---	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Anaerolinea</i>	<i>A. thermophila</i> (DSM16554) (1)		
						<i>A. thermolimosa</i> (DSM14523) (2)		
					<i>Levilinea</i>	<i>L. saccharolytica</i> (DSM16555) (2)		
					<i>Ornatilinea</i>	<i>O. apprima</i> (DSM23815) (3)		
					<i>Thermomarinilinea</i>	<i>T. lacunofontalis</i> (JCM15506) (4)		
					<i>Pelolinea</i>	<i>P. submarina</i> (JCM17238) (5)		
					<i>Leptolinea</i>	<i>L. tardivitalis</i> (DSM16556) (2)		
					<i>Bellilinea</i>	<i>B. caldifistulae</i> (DSM17877) (6)		
					<i>Longilinea</i>	<i>L. arvovzae</i> (JMC13670) (6)		
					<i>Thermanaerotherix</i>	<i>T. daxensis</i> (DSM23592) (7)		
	<i>Flexilinea</i>	<i>F. flocculi</i> (JCM 30897) (8)						
	<i>Caldilineae</i>	<i>Caldilineales</i>	---	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Caldilinea</i>	<i>C. aerophila</i> (DSM14535) (1)		
					<i>C. tarbellica</i> (DSM 22659) (9)			
					<i>Litorilinea</i>	<i>L. aerophila</i> (DSM 25763) (10)		
II	<i>Dehalococcoidia</i>	<i>Dehalococcoidales</i>	---	<i>Dehalococcoidaceae</i>	<i>Dehalococcoides</i>	<i>D. mccartyi</i> (KCTC15142) (11)		
					<i>Dehalogenimonas</i>	<i>D. lykanthroporepellens</i> (JCM15061) (12)		
						<i>D. alkenigignens</i> (JCM17062) (13)		
III	<i>Chloroflexia</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Chloflexineae</i> (37)	<i>Chloroflexaceae</i>	<i>Chloroflexus</i>	<i>C. aurantiacus</i> (DSM635) (14)		
					<i>C. aggregans</i> (DSM9485) (15)			
				<i>Oscillochloridaceae</i>	<i>Oscillochloris</i>	<i>O. trichoides</i> (VKMB2210) (16)		
					<i>Chloronema</i>	<i>C. giganteum</i> (AF345825.1) (17)		
				<i>Roseiflexineae</i> (37)	<i>Roseiflexaceae</i>	<i>Roseiflexus</i>	<i>R. castenholzii</i> (DSM13941) (18)	
						<i>Heliothrix</i>	<i>H. oregonensis</i> (IS/F-1) (19)	
				<i>Kallotenuales</i>	---	<i>Kallotenuaceae</i>	<i>Kallotenua</i>	<i>K. papyrolyticum</i> (DSM26889) (20)
				<i>Herpetosiphonales</i>	---	<i>Herpetosiphonaceae</i>	<i>Herpetosiphon</i>	<i>H. aurantiacus</i> (DSM785) (21)
					<i>H. geysericola</i> (DSM7119) (22)			
IV	Clones ambientales					Cluster SAR 202 (23)		
	<i>Thermomicrobia</i>	<i>Thermomicrobiales</i>	---	<i>Thermomicrobiaceae</i>	<i>Thermomicrobium</i>	<i>T. roseum</i> (DSM5159) (24)		
						<i>T. carboxidum</i> (DSM27067) (25)		
			<i>Termorudis</i>	<i>T. peleae</i> (DSM27169) (25)				
			<i>T. pharmacopila</i> (DSM26011) (26)					
	<i>Sphaerobacterales</i>	---	<i>Sphaerobacteraceae</i>	<i>Sphaerobacter</i>	<i>S. thermophilus</i> (DSM20745) (27)			
				<i>T. terrenum</i> (ATCC BAA-798) (28)				
				<i>Nitrolancetus</i>	<i>N. hollandicus</i> (DSM23161) (29)			
	<i>Ktedonobacteria</i>	<i>Ktedonobacterales</i>	---	<i>Ktedonobacteraceae</i>	<i>Ktedonobacter</i>	<i>K. racemifer</i> (DSM44963) (30)		
				<i>Thermosporotrichaceae</i>	<i>Thermosporothrix</i>	<i>T. hazakensis</i> (JCM 16142) (31)		
					<i>T. narukonensis</i> (NBRC 111777) (32)			
			<i>Thermogemmatisporales</i>	---	<i>Thermogemmatisporaceae</i>	<i>Thermogemmatispora</i>	<i>T. onikobensis</i> (JCM16817) (33)	
					<i>T. foliorum</i> (JMC16818) (33)			
					<i>T. carboxidivorans</i> (DSM45816) (34)			
	<i>Ardenticatenia</i>	<i>Ardenticatenales</i>	---	<i>Ardenticatenaceae</i>	<i>Ardenticatena</i>	<i>A. maritima</i> (JCM17282) (35)		
	<i>Thermoflexia</i>	<i>Thermoflexales</i>	---	<i>Thermoflexaceae</i>	<i>Thermoflexus</i>	<i>T. hugenholtzii</i> (JCM19131) (36)		

El **subfilo I** contiene entre los cuatro subfilos las secuencias más diversas de clones ambientales. Dentro de este subfilo, la clase *Anaerolineae* constituye más del 60% de las secuencias depositadas en la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP). Está integrada por 10 géneros; *Anaerolinea*, *Levilinea*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, *Pelolinea*, *Leptolinea*, *Bellilinea*, *Longilinea*, *Thermanaerotherix* y *Flexilinea*. Por su parte la clase *Caldilineae* contiene los géneros *Caldilinea* y *Litorilinea* (según base de datos del National Center for Biotechnology Information- NCBI).

Las cepas aisladas del subfilo I son filamentos multicelulares mesófilos o moderadamente termófilos. Las cepas de la clase *Anaerolineae* son anaerobias mientras que en la clase *Caldilineae* también se encuentran cepas aerobias y aerobias facultativos. Son organismos quimiolitoheterótrofos, degradadores de carbohidratos y aminoácidos, que no presentan crecimiento en condiciones reductoras desasimilativas de nitrato o sulfato. La mayoría de las cepas se caracterizan por una tasa de crecimiento muy lenta, siendo inhibidos por los organismos de rápido crecimiento. Los tiempo de duplicaciones para la clase *Anaerolineae* están entre 45-100 horas con excepción de *Ornatilinea apprima*, que tiene un tiempo de duplicación de 6 horas y de *Thermomarinilinea lacunofontalis* en la cual dicho tiempo es de 4,6 horas (Nunoura *et al.*, 2013). Para las bacterias de la clase *Caldilineae* este tiempo esta entre 5 y 21 horas (Yamada y Sekiguchi, 2009). En algunos de los organismos de la clase *Anaerolineae* que son productores de H<sub>2</sub> como producto final de la fermentación, la acumulación de H<sub>2</sub> inhibe su crecimiento, por lo que el co-cultivo con bacterias metanogénicas hidrogenotróficas estimula su crecimiento. Es decir ciertos organismos de la clase *Anaerolineae* tienen la necesidad de asociarse con otros microorganismos para un crecimiento eficiente (“sintrofismo”) (Yamada y Sekiguchi, 2009).

En los reactores anaerobios UASB metanogénicos, los organismos de la clase *Anaerolineae* son los más abundantes y forman parte de la capa externa de los gránulos de lodo (Yamada *et al.*, 2005, Yamada y Sekiguchi, 2009).

**El subfilo II** contiene a los organismos de la clase *Dehalococcoidia* integrada por los géneros *Dehalococcoides* (que contiene a *Dehalococcoides ethenogenes*, el primer organismo cultivado del filo) y *Dehalogenimonas* (datos de NCBI).

Son organismos con morfología cocoide que obtienen su energía por un proceso conocido como dehalorespiración reductiva. En este proceso utilizan cloroetenos como aceptores de electrones reduciéndolos a eteno, en un proceso estrictamente dependiente de H<sub>2</sub> como donador de electrones (Maymó-Gatell *et al.*, 1997, He *et al.*, 2003).

Dentro de los compuestos clorados que utilizan se encuentran tetracloroetano (PCE), tricloroetano (TCE), cloruro de vinilo (VC), tetracloroetano (TeCE), y bifenilos policlorados (PCBs). Estos compuestos son muy importantes para la salud debido a su posible acción como agentes tóxicos y/o cancerígenos. Las técnicas de bioremediación utilizan el potencial de estos microorganismos para transformar los compuestos clorados tóxicos en productos inocuos para la salud (Hendrickson *et al.*, 2002).

El **subfilo III** que contiene a los organismos de la clase *Chloroflexia*. Reclasificada por Gupta *et al.* en 2013. Está integrado por los géneros *Chloroflexus*, *Oscillochloris*, *Chloronema*, *Roseiflexus*, *Heliolithrix*, *Herpetosiphon* y *Kallotenue* (tabla1). Estos organismos poseen morfología filamentosa y muestran un crecimiento fotoheterotrófico y/o quimiolitotrófico, bajo condiciones mesófilas o moderadamente termófilas (Yamada y Sekiguchi, 2009).

El **subfilo IV** contiene clones ambientales provenientes mayormente de ambientes marinos y de lagos, sin representantes cultivables (Björnsson *et al.*, 2002, Yamada y Sekiguchi, 2009).

La clase *Thermomicrobia*, contiene a los géneros *Thermomicrobium*, *Termorudis*, *Sphaerobacter* y *Nitrolancetus*. Representan un linaje distinto dentro del filo. Son organismos quimiolitoheterotróficos, moderadamente termófilos con morfología de bastones (Björnsson *et al.*, 2002). El género *Nitrolancetus* contiene al primer organismo nitrificante reconocido dentro de los OFC. Fue aislada de un lodo de un bioreactor nitrificante, que mostraba una alta actividad nitrito-oxidante pero que no contenía cantidades significativas de bacterias nitrito-oxidantes (NOB) (Sorokin *et al.*, 2012)

La clase *Ktedonobacteria* está integrada por los géneros *Ktedonobacter* y *Thermosporothrix* y *Thermogemmatispora*. El microorganismo aislado del género *Ktedonobacter*, fue obtenido de una muestra de suelos. Es una bacteria aerobia, mesófila heterotrófica y capaz de crecer también en condiciones de microaerobiosis. Es un microorganismo no móvil, que presenta una morfología filamentosa, que en medios sólidos y líquidos tiene micelios ramificados (Chang *et al.*, 2011). Los microorganismos aislados del género *Thermosporothrix*, fueron obtenidos de un compost maduro utilizado para el tratamiento de excremento de ganado y de muestras de hojas caídas en suelos geotermales. Son bacterias filamentosas, termófilas, aerobias y formadoras de esporas no móviles, que formaban micelios vegetativos y aéreos ramificados (Yabe *et al.*, 2010 y 2016). Los organismos del género *Thermogemmatispora* fueron obtenidos de muestras de hojas caídas

en suelos geotermales. Son bacterias aerobias, heterótrofas, termófilas, filamentosas, con micelios ramificado y formadoras de esporas (Yabe *et al.*, 2010 y 2016).

La clase *Ardenticatenia* contiene a la especie *Ardenticatena marítima*, dentro del género *Ardenticatena*. Esta especie aislada de muestras de la costa hidrotermal volcánica rica en hierro en Japón, es la única descrita dentro del filo *Chloroflexi* con la capacidad crecer con la reducción desasimilativa de Fe (III) a Fe (II). Es una bacteria flexible, no móvil, con forma de filamento septado, con una membrana citoplasmática rodeada por una capa superficial formando una estructura de multicapa, formado agregados al crecer sin agitación. Es una bacteria aerobia facultativa, quimioheterotrófica que no puede crecer eficientemente por medio de la fermentación. En condiciones aerobias utiliza O<sub>2</sub> como aceptor de electrones y también puede crecer anaeróticamente utilizando NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ferrihidrita o citrato férrico como aceptores de electrones (Kawaichi *et al.*, 2013).

La clase *Thermoflexia* contiene a la especie *Thermoflexus hugenholtzii* aislada de sedimentos de una fuente termal. Es una bacteria que no forma esporas, anaerobia facultativa que puede crecer en microaerobiosis hasta un 8 % v/v de O<sub>2</sub>, termófila, filamentosas y heterotrófa (Dodsworth, *et al.*, 2014).

La prevalencia de los Organismos del filo *Chloroflexi* (OFC) en un amplio rango de ecosistemas naturales sugiere un importante significado ecológico y fisiológico. Uno de los hábitats artificiales más reconocidos donde los integrantes del filo son detectados con frecuencia, son en los lodos de los sistemas de tratamiento de efluentes (Fang, 2000, Björnsson *et al.*, 2002, Etchebehere *et al.*, 2002, Juretschko *et al.*, 2002, Fernández *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2008).

Aunque se desconoce su función en dichas comunidades microbianas, se cree que puedan tener un papel importante. Esto es debido a que las variaciones en la cantidad de organismos presentes, se corresponden con problemas en el funcionamiento de estos sistemas tratamientos artificiales (Yamada y Sekiguchi, 2009). Microorganismos pertenecientes a este filo, fueron detectados por el equipo de trabajo de la Dra. C. Etchebehere en lodos de reactores de tratamiento de efluentes a escala real y de laboratorio. Se ha planteado que estos organismos podían tener una función como degradadores iniciales de macromoléculas como azúcares, almidón y restos celulares en los consorcios bacterianos (Bossier y Verstraete, 1996, Björnsson *et al.* 2002, Koizumi *et al.*, 2004, Kindaichi *et al.*, 2004, Kragelund *et al.*, 2007).

Yamada y Sekiguchi en 2009, concluyeron que la función fisiológica *in situ* de los filamentos del subfilo I en los lodos anaerobios de reactores UASB donde

fundamentalmente predominan los de la clase *Anaerolineae*, sería la degradación de carbohidratos (degradadores heterotróficos en la capa exterior de los gránulos) y materiales celulares (cuando se encuentran dentro de los gránulos), es decir como metabolizadores primarios de sustratos. Su morfología filamentosa sería muy importante para la granulación así como para su propia retención dentro de los gránulos. Sin embargo la sobrepoblación de los mismos se asociaba al fenómeno de flotación de los lodos o “bulking”.

Por otro lado, a pesar que no se han aislado cepas de la clase *Anaerolineae* en ambientes oxigenados, se han recuperado frecuentemente en sistemas oxigenados como los lodos activados donde podrían actuar estabilizando el “esqueleto” de los flóculos (Björnsson *et al.*, 2002, Kindaichi *et al.*, 2004). Utilizando las técnicas de microautoradiografía y *FISH* (MAR-*FISH*), se detectó que estos organismos consumían material celular como N-acetilglicosamina (NAG), aminoácidos, así como también carbohidratos (Kindaichi *et al.*, 2004, Miura y Okabe, 2008). Parecen estar especializados en la degradación de varios polisacáridos a monosacáridos por la acción de varias exo-enzimas, se desarrollarían en coloides en la matriz de expolímeros secretadas por otros microorganismos, donde quedarían atrapadas las partículas del efluente entrante y los detritus celulares (Kragelund *et al.*, 2007). También se ha reportado su asociación con el fenómeno de “bulking” filamentoso aéreo (Speirs *et al.*, 2009).

## **1.2 Sistemas de tratamientos de efluentes**

Los sistemas acuáticos naturales, tienen la capacidad intrínseca de recuperarse del impacto producido por la descarga de aguas residuales provenientes fundamentalmente de la actividad humana. Este proceso es conocido como autodepuración, donde interviene una población de organismos, variada, compleja y en constante competencia. El impacto de las aguas residuales y la capacidad de recuperación en estos ecosistemas naturales dependen de la composición química, cantidad y velocidad en que son vertidas al medio.

Para la degradación de los contaminantes orgánicos en los sistemas de tratamiento de efluentes, se siguen en general las mismas secuencias que los sistemas naturales. Sin embargo al trabajar en condiciones “controladas”, permiten minimizar los tiempos de tratamiento y aumentar la carga inicial del sistema, sin que estos sistemas pierdan la condición de retornar al equilibrio y así satisfacer los requerimientos de calidad y cantidad del agua a ser descargada (Lippel, 2005).

La remoción y la degradación de la materia orgánica constituyen uno de los objetivos del tratamiento de las aguas residuales y puede llevarse a cabo tanto en condiciones aerobias (en presencia de  $O_2$ ) como anaerobias (en ausencia de  $O_2$ ) (Rodríguez, 2002).

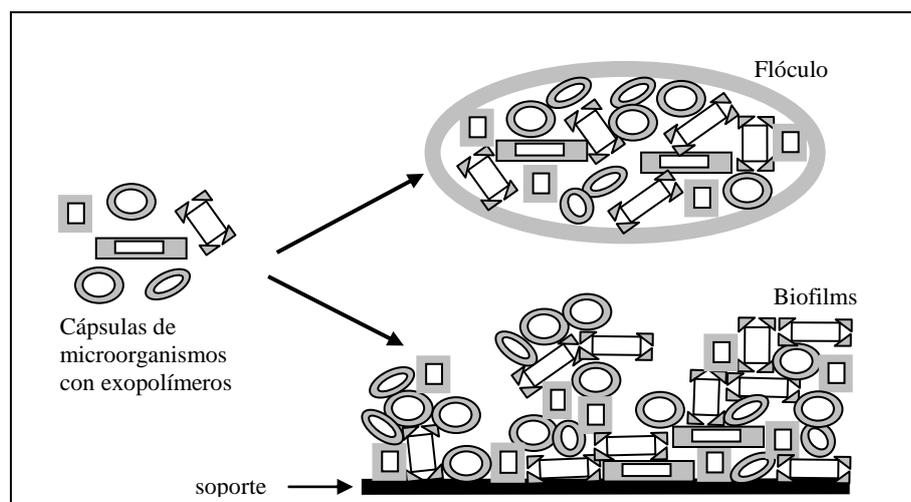
En los **tratamientos aerobios** se llevan a cabo procesos catabólicos oxidativos que requieren de la presencia de un oxidante. Como éste no está presente en las aguas residuales, la forma más conveniente de introducir un oxidante es por la disolución del oxígeno de la atmósfera, utilizando la aireación mecánica.

En los **tratamientos anaerobios** se llevan a cabo procesos fermentativos que convierten la materia orgánica en metano y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno. Como no hay presencia de un oxidante en el proceso, la capacidad de transferencia de electrones de la materia orgánica permanece intacta en el metano producido. Se caracterizan en que solo una pequeña parte de la energía libre es liberada, mientras que la mayor parte de esa energía permanece como energía química en el  $CH_4$  producido (Rodríguez, 2002).

### Sistemas de tratamientos aerobios

En los sistemas de tratamientos aerobios la biomasa se encuentra formando flóculos. Estos flóculos son fundamentales para la sedimentación del lodo en el sedimentador. La formación de aglomerados microbianos se debe a la producción de exopolímeros que están constituidos por polisacáridos, los que forman una matriz porosa altamente hidratada en su superficie.

Los aglomerados microbianos, como flóculos y biofilms, pueden ser vistos como un microecosistema que presenta una dinámica poblacional que depende de las condiciones ambientales y nutricionales de la fase acuosa (fig. 1).



**Fig. 1** Representación esquemática de la formación de cápsulas y agregación microbiana en la formación de flóculos y biofilms. Modificado de Schmidell *et al.*, 2005.

La propiedad de sedimentar con facilidad presentada por los flóculos es denominada sedimentabilidad que puede verse afectada por las variaciones del proceso. Las alteraciones más comunes son: la variación en el aporte de nutrientes, exceso o insuficiencia de O<sub>2</sub> disuelto en el medio, variaciones de salinidad de la fase acuosa, cambios de pH y temperatura, presencia de sustancias tóxicas en el efluente, entre otros (Schmidell *et al.*, 2007).

En estos sistemas la comunidad bacteriana puede ser clasificada en dos grupos: formadoras de flóculos y formadoras de filamentos o filamentosas. Para poseer adecuadas propiedades de sedimentación los flóculos deben tener poblaciones equilibradas de estos dos grupos. Una escasa presencia de filamentos, forma flóculos pequeños (microflóculos o Pin Flocc), que presentan generalmente problemas de sedimentación. Por otro lado, un exceso de microorganismos filamentosos, también causa problemas de sedimentación, formando grandes agregados que tienden a flotar en el medio, fenómeno conocido como entumecimiento del lodo o “**bulking**”. Por otro lado, una alta producción de exopolímeros forma una masa gelatinosa o viscosa de reducida sedimentación, fenómeno conocido como **bulking no filamentoso**. Otro evento muy frecuente es la formación de espuma, que también es perjudicial para el proceso de tratamiento de aguas residuales (Schmidell *et al.*, 2007).

La comunidad bacteriana en los flóculos y biofilms en condiciones aerobias son muy diversas. Predominan las bacterias aerobias heterotróficas (que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono), que conviven con las bacterias autotróficas (utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono). Dentro de estas últimas se encuentran las que llevan a cabo el proceso de nitrificación que ocurre en los tratamientos aerobios convencionales, dependiendo de las condiciones operacionales y ambientales del proceso (Schmidell *et al.*, 2007).

Mediante el proceso de degradación aerobia, los contaminantes presentes en la fase acuosa son primeramente adsorbidos en la superficie del flóculo o biofilm. Las partículas de mayor tamaño pueden entonces sufrir modificaciones catalizadas por enzimas extracelulares. A continuación las moléculas de menor tamaño son transportadas hacia el interior de la matriz exopolímera hasta llegar a la superficie de las células. La última etapa del proceso consiste en la asimilación de las sustancias por los microorganismos, una vez transportadas al interior de las células son encaminadas a rutas metabólicas específicas (Schmidell *et al.*, 2007).

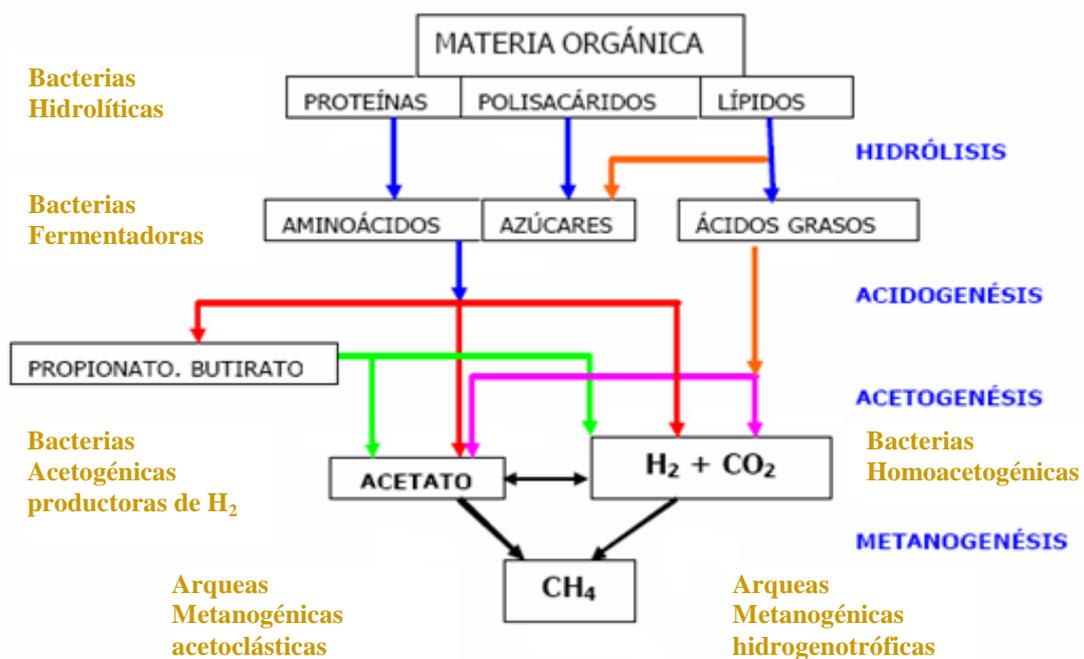
## Sistemas de tratamiento anaerobios

La digestión anaerobia es un proceso por el cual a través de la acción de distintos grupos de bacterias y arqueas, la materia orgánica sufre una serie de procesos oxidativos secuenciales que culminan con la formación de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Este proceso ocurre en ausencia de luz y de aceptores de electrones inorgánicos. Los electrones son finalmente transferidos al  $\text{CO}_2$ , que es el aceptor terminal en esta compleja cadena trófica de microorganismos (Schmidell *et al.*, 2007).

En este proceso se distinguen tres etapas; 1)- hidrólisis y fermentación, 2)- acetogénesis y 3)- metanogénesis. Requiere la intervención de diversos grupos de bacterias facultativas y anaerobias estrictas, las cuales utilizan en forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo, lo que permite entender la necesidad de una estrecha cooperación entre los diferentes grupos fisiológicos de microorganismos. Finalmente las arqueas metanogénicas producen  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  (fig. 2).

### 1)- Hidrólisis y fermentación

El proceso se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares producidas por las bacterias hidrolíticas. Las moléculas de bajo peso molecular producto de estas reacciones, son transportados a través de la membrana celular al interior de las células.



**Fig. 2.** Esquema del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica a partir de proteínas, polisacáridos y lípidos. Tomado y modificado de Rodríguez, 2002.

Allí son fermentadas por bacterias fermentadoras primarias a ácidos grasos con bajo número de carbonos, así como a compuestos reducidos como el etanol, además de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Rodríguez, 2002, Schmidell *et al.*, 2007).

Esta etapa es llevada a cabo por bacterias anaerobias facultativas. La proporción de los diferentes grupos de bacterias que participan, varían según el ambiente en que se encuentren. Fundamentalmente se encuentran organismos de los filos *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, y *Synergistetes* (Rivière *et al.*, 2009).

## **2)- Acetogénesis**

Los productos de fermentación son degradados a acetato/H<sub>2</sub> por las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno, y a H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> por las bacterias homoacetogénicas. La degradación de estos compuestos es energéticamente desfavorable en condiciones estándar, pero la reacción se vuelve favorable en presencia de bacterias metanogénicas que consumen eficientemente el hidrógeno generado. La asociación de bacterias para desplazar un equilibrio termodinámicamente desfavorable es conocido como sintrofismo. Si por distintas causas aumenta la concentración de H<sub>2</sub> en el sistema, cesa el metabolismo de las bacterias acetogénicas y comienzan a acumularse ácidos grasos volátiles (Rodríguez, 2002, Schmidell *et al.*, 2007).

La oxidación de los productos de la fermentación a acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> es llevada a cabo por bacterias conocidas como “organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OHPA)”. Las especies aisladas más representativas en los lodos anaeróbicos son *Syntromonas wolfei*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophus buswellii* y *Syntrophomonas sapovorans* (Rodríguez, 2002, Fang, 2000, Ariesyady *et al.*, 2007).

Dentro de las bacterias homoacetogénicas que son anaerobias obligadas y utilizan el CO<sub>2</sub>, como aceptor final de electrones, produciendo acetato como producto único de la fermentación anaerobia. Aunque no es un grupo taxonómico definido, en él se incluyen una variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, de alto y de bajo contenido G+C, formadoras de esporas como algunas especies de *Clostridium*, y otros *Firmicutes* como *Acetobacterium* (Díaz-Báez, *et al.*, 2002; Ariesyady *et al.*, 2007).

## **3)-Metanogénesis**

Es llevada a cabo por organismos metanogénicos estrictamente anaerobios del dominio *Archaea*. Convierten el acetato a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (bacterias metanogénicas acetoclásticas), o reducen el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> (bacterias metanogénicas hidrogenotróficas). Son los únicos organismos capaces de producir CH<sub>4</sub> debido a que poseen enzimas y cofactores exclusivos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden habitar lugares muy

extremos debido a la composición química particular de algunas estructuras celulares, sin embargo, la presencia de otros aceptores de electrones inhibe reversiblemente el proceso de metanogénesis (Rodríguez, 2002, Schmidell *et al.*, 2007).

La habilidad de catabolizar el acetato a CH<sub>4</sub> en la naturaleza está limitada a los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (*Methanotrix*). Es frecuente encontrar en reactores anaerobios una competencia por el acetato entre estos dos géneros. Las bajas concentraciones de acetato que usualmente predominan en el interior de los reactores favorece el crecimiento de las *Methanosaeta*. Los sistemas de tratamiento metanogénicas pueden presentar fallas en su funcionamiento debido a que las bacterias metanogénicas son sensibles a sustancias tóxicas generadas en el proceso o presentes en el sistema (Díaz-Báez, 2002, Schmidell *et al.*, 2007).

Como se verá más adelante, en los reactores tipo UASB anaerobios la biomasa se encuentra formando gránulos. Existen varias teorías sobre el proceso de formación de los gránulos metanogénicos. Algunas bacterias metanogénicas presentan morfología filamentosa lo que provee de soporte al gránulo. Se sabe que los gránulos están compuestos por varias capas, donde las bacterias fermentadoras primarias y las hidrolíticas se encuentran en la capa más externa y en la capa más interna se encuentran las bacterias acetogénicas y metanogénicas. La disposición de microorganismos en distintas capas favorece la transferencia de H<sub>2</sub> interespecies y además protege a las bacterias individuales de efectos ambientales adversos como la variación de pH, el ingreso de sustancias tóxicas y el aumento abrupto de la concentración de sustratos (Fang, 2000).

## **Biorreactores de tratamientos de efluentes**

El objetivo de estos bioreactores es generar el ambiente adecuado para la actividad microbiológica a gran escala, satisfaciendo las condiciones de calidad y cantidad requeridas para el agua a tratar.

Para ello es necesario el conocimiento de ciertos parámetros como: velocidad de crecimiento y requerimientos nutricionales de los microorganismos, factor de conversión del sustrato consumido en biomasa y velocidad de eliminación de contaminantes por unidad de biomasa. Dichos datos se obtienen de plantas ya existentes o de experimentos en plantas a escala de laboratorio o piloto (Bertola *et al.*, 1999).

Los reactores pueden clasificarse de diferentes maneras como ser: aerobios/anaerobios, continuos/discontinuos, masa suspendida /masa inmovilizada.

### **Reactores aerobios y anaerobios**

La diferencia principal entre ambos tipos de reactores, es la exclusión del oxígeno en los **reactores anaerobios**. Esto se logra con ambientes cerrados o en sistemas donde existe estratificación del agua, con el consiguiente agotamiento del oxígeno, como por ejemplo en las lagunas anaerobias y en el fondo de las lagunas facultativas. Otra razón por la que los reactores anaeróbicos deben ser cerrados, es el olor producido en las reacciones fermentativas, por lo que necesitan de un sistema adecuado de ventilación. En estos sistemas la población microbiana se reproduce lentamente, requiriendo mayores tiempos de residencia de la masa de agua a tratar.

Por otro lado, los **reactores aerobios** que contienen biomasa suspendida, requieren del suministro de oxígeno (aireadores), por lo que se debe tener una interfase de agua-aire grande para mantener al sistema funcionando. Obtienen un alto grado de eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, permitiendo además el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales (Bertola *et al.*, 1999, Schmidell *et al.*, 2007).

### **Reactores continuos y discontinuos**

En los **reactores continuos**, una corriente de agua residual es continuamente alimentada al reactor, mientras que otra corriente es continuamente eliminada por la salida. Tiene la desventaja que si el reactor falla y no se corrige, la descarga del efluente no cumplirá los requerimientos.

En los **reactores discontinuos (batch)**, el reactor se llena con el agua residual a tratar y se espera el tiempo necesario para obtener las condiciones del efluente requeridas. Se utilizan para el tratamiento de pequeños volúmenes de agua, sólidos (compostaje), y tienen el tiempo de residencia es muy alto.

Existe un sistema intermedio denominado reactores **discontinuos secuenciales (sequencial batch o SBR)**. Un mismo reactor opera en una serie de períodos llenado, reacción, sedimentación, extracción, y fase inactiva (que se puede omitir) que constituyen un ciclo, siendo la manipulación de estos períodos lo que varía la condición del efluente. Durante el período de reacción tienen lugar los procesos de remoción de carbono, nitrificación, desnitrificación y remoción del fósforo. En el periodo de sedimentación, los sólidos (la biomasa y partículas de sustrato) sedimentan y dejan un sobrenadante relativamente claro (Schmidell *et al.*, 2007).

### **Reactores de biomasa suspendida y biomasa inmovilizada**

En los **reactores de biomasa suspendida**, los microorganismos encargados de la degradación están suspendidos en el líquido, por lo que para evitar su pérdida con el agua

tratada se deben recuperar y reincorporar al reactor. En general se utiliza para esto un **sedimentador**.

En los **reactores con biomasa inmovilizada** se utilizan un soporte para prevenir que la biomasa salga del reactor. La biomasa se inmoviliza o adhiere a un soporte sólido inerte, que sea lo suficientemente liviano para permitir su suspensión, pero que no sea eliminado con el efluente. Tienen la capacidad de operar con carga orgánica elevada sin riesgo de perder biomasa (Schmidell *et al.*, 2007).

## Tipos de reactores anaerobios

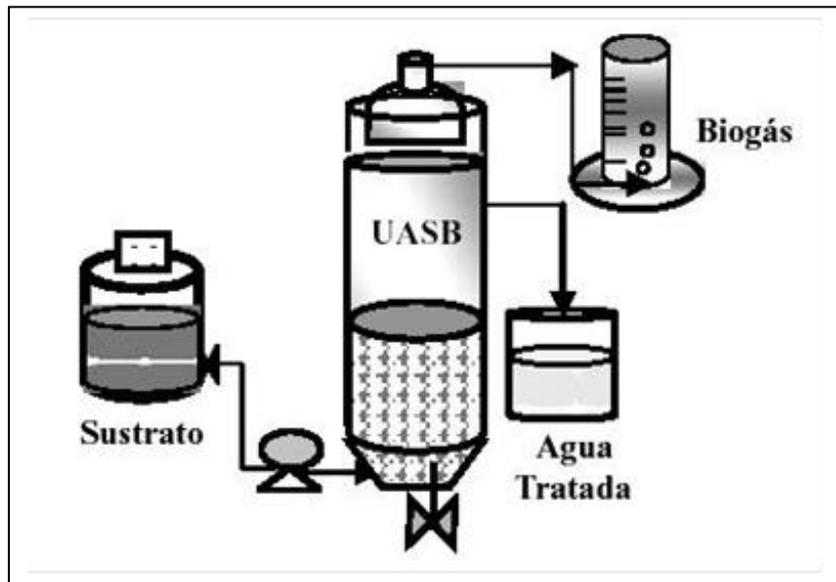
En la tabla 2 se muestra la clasificación de los reactores anaerobios según la masa este suspendida o inmovilizada.

### Reactores UASB

Su funcionamiento se basa en la formación de un lodo granular con buena capacidad de sedimentación y alta actividad biológica. Está formado por un tanque, donde el afluente entra por el fondo de este y lo recorre en un flujo ascendente hasta la salida en la parte superior (fig. 3).

Biomasa en suspensión	Biomasa fija
Lagunas anaerobias	Filtros anaerobios (AF)
De contacto (ACP)	Biodiscos rotatorios (RBC)
De flujo ascendente con lecho de lodos (UASB)	De lecho expandido y lecho fluido (FB/LEB)
De mezcla completa	De contacto con soporte (CASBER)
Por lotes en serie (SBR)	
Con deflectores (ABR)	
Lecho expandido o fluidificado (RALF)	

**Tabla 2.** Tipos de reactores anaerobios según el estado en que se encuentre la masa, suspendida o inmovilizada. Tomado de Schmidell, *et al.*, 2007.



**Fig.3.** Esquema de un reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodo (UASB). Tomado de Caldera *et al.*, 2005.

Durante el recorrido del agua, la materia orgánica soluble va siendo degradada y transformada en biogás ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ). La velocidad de ascenso del líquido en el interior del reactor y la producción de gas proveen de agitación al sistema haciendo que se resuspendan los sólidos sedimentados en el fondo. En la parte superior el reactor posee un dispositivo que permite separar la biomasa, el efluente tratado y el biogás (separador de tres fases, sólido-líquido-gaseoso).

Las bacterias y arqueas anaerobias especializadas que habitan en los gránulos, convierten los contaminantes complejos a metano. La degradación de la materia orgánica presente en el afluente se inicia con la hidrólisis y acidificación, finalizando en la producción de metano que se pone de manifestado en la parte superior del reactor. En este tipo de reactores digiere el 70% de la materia orgánica mientras que el 30% se elimina con el efluente (Schmidell *et al.*, 2007).

Muchos factores pueden afectar la granulación y determinar fallas en el funcionamiento del reactor. Como por ejemplo las propiedades fisicoquímicas de los constituyentes del lodo, la hidrofobicidad de la superficie de las células, la presencia de polímeros extracelulares y la composición de la flora microbiana. El sobrecrecimiento de los organismos filamentosos al igual que en los lodos aerobios, provoca el fenómeno de “bulking” y la pérdida de la sedimentabilidad de los gránulos, lo que deriva en el mal funcionamiento del reactor (Martins *et al.*, 2004, Schmidell *et al.*, 2007).

## Reactores discontinuos secuenciales (SBR)

Los reactores SBR (Sequencing Batch Reactor) son reactores operados bajo una serie de etapas que constituyen un ciclo. El ciclo consiste generalmente en periodos de llenado, reacción, sedimentación, extracción y fase inactiva (esta última se puede omitir), siendo la manipulación de estos períodos lo que varía la condición del efluente. Esta operación permite que un reactor simple actúe como una serie de reactores secuenciales y un sedimentador (fig. 4).

En la etapa de **llenado** el agua residual que ingresa es agregada a la biomasa del ciclo anterior que se encuentra en el tanque. La extensión de este período depende del volumen del SBR y la naturaleza del efluente a tratar. El llenado es intermitente y el reactor puede o no ser agitado durante ese período.

Luego, en el período de **reacción** el reactor puede o no ser aireado dependiendo del objetivo del mismo. En esta etapa tienen lugar los procesos de remoción de carbono, nitrificación, desnitrificación y remoción del fósforo. La nitrificación es el pasaje de amonio a nitrito y posteriormente nitrato si se airea el reactor por el suficiente tiempo. El nitrato formado puede también sufrir una segunda reacción en anaerobiosis denominada desnitrificación, donde el nitrato formado pasa a nitrito, NO, N<sub>2</sub>O y finalmente N<sub>2</sub>.

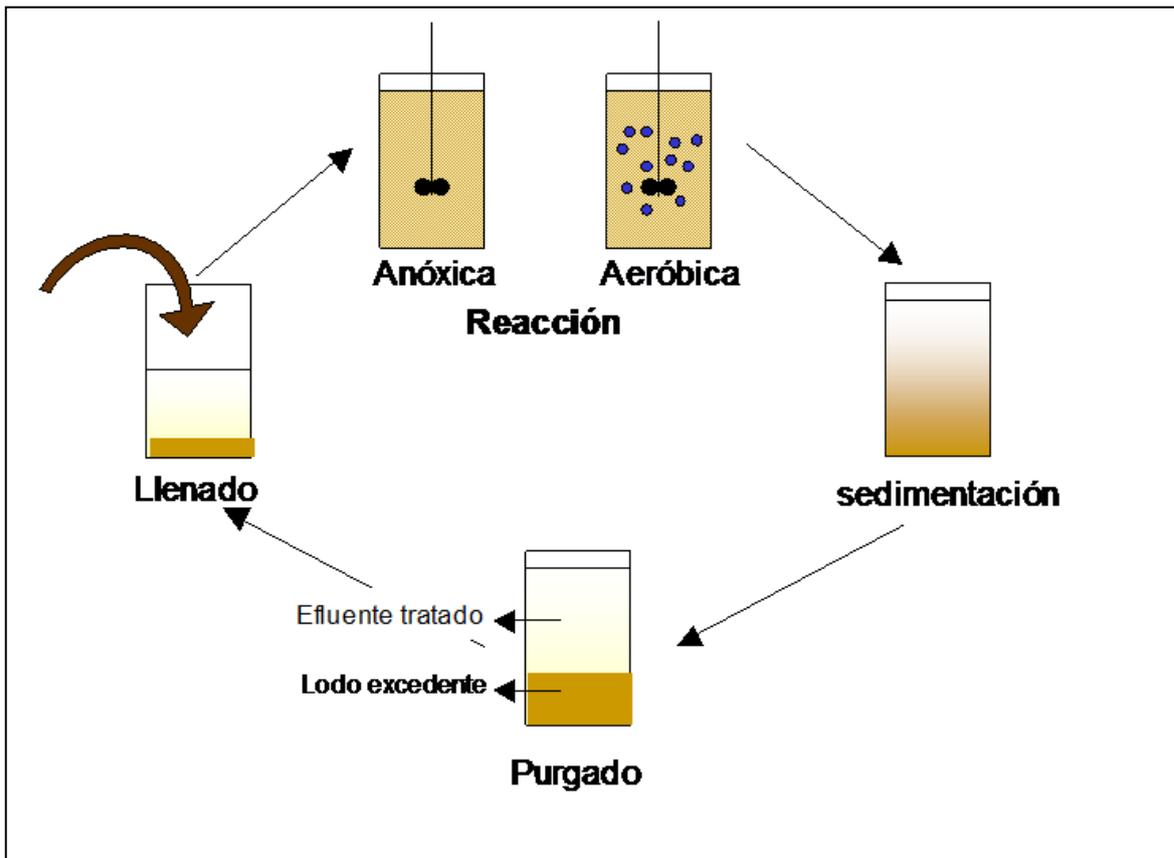
En la etapa de **sedimentación** puede ocurrir la desnitrificación u otros procesos anaerobios. Esta etapa consiste en la decantación de los sólidos (la biomasa y partículas de sustrato) hacia el fondo del reactor, y dejar un sobrenadante relativamente claro de modo de poder vaciar el reactor en la próxima etapa para comenzar un nuevo ciclo.

La última etapa recibe el nombre de extracción o **purgado** y consiste en el vaciado del efluente y el purgado del lodo excedente.

Las principales ventajas de estos reactores son los altos rendimientos de eliminación de nitrógeno, materia orgánica biodegradable, y la adaptabilidad a cambios en las condiciones de operación. Otra ventaja importante es la disminución de los costos de inversión y mantenimiento ya que constan de un solo reactor donde ocurren las dos etapas (aerobia y anaerobia) (Schmidell *et al.*, 2007, Travers, 2008).

## Reactores con retención de biomasa

Un requisito fundamental para estos sistemas de tratamiento de efluentes es que la biomasa quede retenida en el reactor. Esto tiene dos explicaciones, por un lado para que no se pierda la biomasa activa del sistema, y por otro para evitar la contaminación del agua de salida del reactor, es decir del efluente del reactor.



**Fig. 4.** Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR nitrificante-desnitrificante Tomado de Travers, 2008.

Esto se logra con diversos sistemas de retención de células, por ejemplo en los reactores tipo lodos activados y SBR con la formación de flóculos, y en los reactores tipo UASB con la formación de gránulos.

No sólo es necesario lograr la formación de flóculos o gránulos adecuados, sino también lograr que éstos presenten una buena capacidad de sedimentación. Si las células no sedimentan, el lodo se “flota” (fenómeno conocido como entumecimiento o bulking del lodo) se produce pérdida de biomasa y una pérdida de eficiencia del sistema (Schmidell *et al.*, 2007, Travers, 2008).

### 1.3 Sistemas desnitrificantes

La desnitrificación es una vía respiratoria llevada a cabo por un amplio grupo de microorganismos, tanto del dominio *Bacteria*, *Archaea* como *Eucarya*, que son capaces de la transferencia de electrones entre un dador de electrones reducido (materia orgánica) y utilizar nitrato como aceptor final de electrones. Es un proceso en el cual los nitratos son reducidos a nitrógeno gaseoso teniendo como intermediarios el nitrito, óxido nítrico, y

óxido nitroso. El uso de nitrato conlleva a una obtención ligeramente inferior de energía que con O<sub>2</sub> pero superior a la que se obtendría con sulfato como aceptor final.

La mayoría de las bacterias desnitrificantes son heterótrofas (aunque algunas pueden crecer autotróficamente con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> o con compuestos del azufre reducidos), en general son aerobias facultativas, con capacidad de reducir el nitrato a nitrógeno gaseoso en anaerobiosis o con baja tensión de O<sub>2</sub>. Existen reportes de microorganismos desnitrificantes anaerobios estrictos y microorganismos que reducen simultáneamente oxígeno y nitrato lo que le da la capacidad de desnitrificar en presencia de O<sub>2</sub>, por ejemplo *Paracoccus pantotrophus* (Richardson, D., 2000), *Microvirgula aerodesnitrificans* (Takaya *et al.*, 2003) y *Thauera mechernichensis* (Scholten, *et al.*, 1999) (Schmidell *et al.*, 2007).

Las bacterias desnitrificantes más frecuentemente aisladas se afilian dentro de las subclases alfa, beta, gama o epsilon de *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* aunque no siguen un patrón de distribución reconocible (Zumft *et al.*, 1997).

## 1.4 Bases de las técnicas moleculares utilizadas en este trabajo

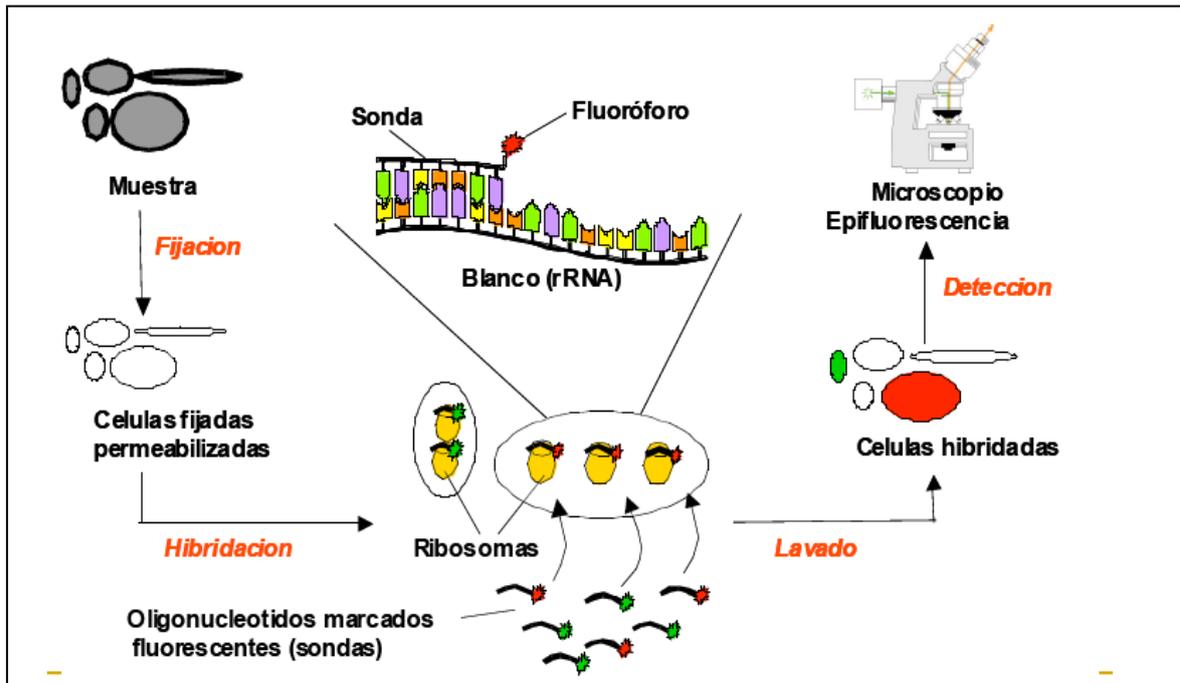
### Hibridación *in situ* fluorescente: *FISH*

La técnica de *FISH* (Fluorescent *in situ* hybridization) consiste en la detección de microorganismos a partir de células morfológicamente intactas, basándose en la secuencia del gen ARNr. Para ello se utilizan sondas fluorescentes complementarias al ARNr 16S o 23S que se unirán al ribosoma y marcarán la célula (fig. 5).

Esta técnica permite:

- Identificar y cuantificar en una muestra tanto organismos cultivables así como no cultivables, como por ejemplo la mayoría de los microorganismos del filo *Chloroflexi*.
- Visualizar las relaciones espaciales de microorganismos en comunidades como lodos activados, gránulos de lodo, etc.
- Monitorear las dinámicas de poblaciones.
- La identificación morfológica de los diferentes tipos de organismos en el medio ambiente y/o los enriquecimientos (Travers, 2003, Amann *et al.*, 2001).

**Fig. 5.** Esquema de la metodología llevada a cabo en la técnica de *FISH*. Las muestras se fijan en un portaobjeto, las sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia se hibridan con la muestra, se lava el exceso de sondas, y se utiliza la microscopía de epifluorescencia para ver la ubicación de las células hibridadas. Tomado de <http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Baxter/MolecularTool.html>



### Polimorfismos del largo de fragmentos de restricción terminales

(terminal restriction fragment length polymorphism: T-RFLP)

La técnica consiste en someter un fragmento de ADN que generalmente codifica un gen (en este caso el gen ARNr de 16S) a la acción de una o más enzimas de restricción. El tamaño de los fragmentos resultantes dependerá de la secuencia de ADN por lo que dos moléculas de ADN con distinta secuencia generaran distinto patrón de fragmentos de ADN que pueden visualizarse en un secuenciador capilar separándolos por electroforesis. Se utiliza el primer forward marcado con un compuesto fluorescente de manera que el detector del secuenciador detecta el fragmento 5' (fig. 6).

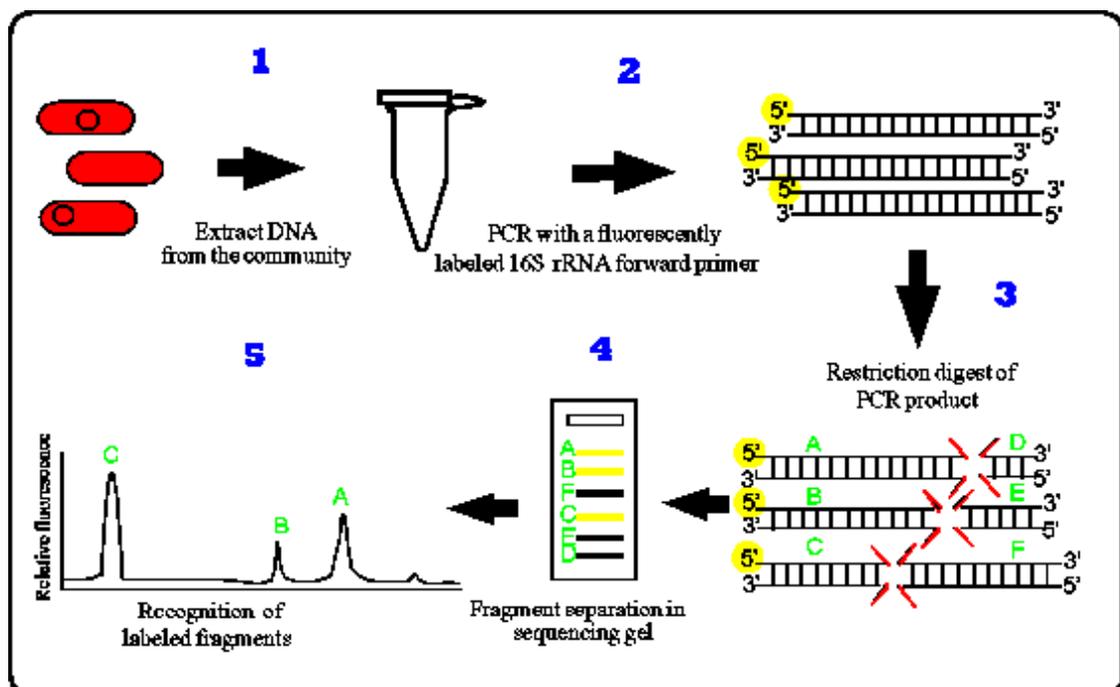


Fig. 6. Esquema del protocolo para T-RFLP. Tomado de Cabezas, 2005.

## 1.5 Antecedentes del trabajo

El grupo de investigación de la Dra. Etchebehere ha trabajado en el tema de la detección de OFC desde el 2002. Durante estos estudios se pudo observar que, en la mayoría de los reactores de tratamiento de aguas residuales estudiados, se detectó la presencia de organismos del filo *Chloroflexi*. La primera observación ocurrió estudiando la composición microbiana de reactores desnitrificantes. En estos reactores se esperaba obtener una alta abundancia de bacterias desnitrificantes, sin embargo, se detectó además un 12 % de organismos pertenecientes al filo *Chloroflexi* (según el análisis de la secuencia del gen del ARNr de 16S), cuyo rol era totalmente desconocido (Etchebehere *et al.*, 2002). En estudios posteriores en reactores de laboratorio nitrificantes-desnitrificantes, también se detectó la presencia de estos organismos mediante técnicas de análisis de la secuencia del gen del ARNr de 16S. Como estos organismos se encontraron en baja proporción, se decidió utilizar diferentes primers específicos para poder estudiarlos. En la Tabla 8 se muestra los diferentes reactores estudiados la metodología y los clones cuya secuencia presentó alta homología con secuencias de OFC. Para poder comparar los organismos encontrados en los diferentes reactores estudiados, en esta Tesis se realizó estudios filogenéticos con todas las secuencias obtenidas previamente.

Incorporando técnicas de hibridación *in situ* fluorescente se observó que estos organismos presentaban morfología filamentosa (Cabezas *et al.*, 2005, 2006, 2009).

En colaboración con el Centro de Ecología Microbiana de la Michigan State University de Estados Unidos, se decidió estudiar estos microorganismos en muestras de un reactor a escala real de tipo SBR nitrificante-desnitrificante de post tratamiento del agua residual de una curtiembre. Durante el trabajo en Estados Unidos se realizaron enriquecimientos con lodos de este reactor utilizando diferentes condiciones de crecimiento (Tabla 7). El objetivo de estos enriquecimientos fue determinar si en alguna de estas condiciones era posible enriquecer en estos microorganismos. Para determinar la presencia de OFC se utilizó la técnica de *FISH* mediante sondas específicas. Luego de un año de incubación, se tomaron muestras de estos enriquecimientos y se realizó el análisis de la comunidad microbiana mediante bibliotecas de clones del gen del ARNr de 16S con la finalidad de conocer los organismos enriquecidos en cada condición. En este trabajo de Tesis se utilizó muestras de lodo de este mismo reactor para los diferentes enriquecimientos realizados y se analizó los clones de cada biblioteca obtenida previamente mediante amplificación por

PCR de los insertos, determinación de su secuencia y comparación con secuencias de bancos de datos.

Por otro lado, en el año 2008, investigadores del Departamento de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería de la UDELAR detectaron problemas de pérdida de eficiencia en el reactor metanogénico escala real de una industria procesadora de malta que estaba operando eficientemente por varios años. Esta pérdida de eficiencia se asoció a la mala sedimentación de la biomasa. Se decidió estudiar las causas de este problema y se observó que era debido al sobrecrecimiento de bacterias filamentosas. Los filamentos formaban proyecciones en los gránulos produciendo la pérdida de densidad y su flotación. Mediante la técnica de *FISH* se caracterizaron estos filamentos como pertenecientes al filo *Chloroflexi*. Se hipotetizó que este sobrecrecimiento podría estar relacionado con un alto contenido de células del reactor y con la lisis celular debida a una subida abrupta del pH. Los resultados de este trabajo, además de buscar soluciones al problema de la industria, permitieron publicar un trabajo en conjunto (Borzacconi *et al.*, 2008).

A pesar de los avances en el tema durante estos años de trabajo, quedan muchas incógnitas sin responder. En particular no se conoce la función de estos organismos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales que explique su persistencia en diferentes tipos de reactores. En este trabajo de Tesis se pretende aportar conocimiento sobre este tema tan poco estudiado.

## **2. Objetivo general**

Generar conocimiento que permita explicar el rol de organismos del filo *Chloroflexi* (OFC) en sistemas de tratamientos de efluentes.

### **Objetivos específicos**

Enriquecer en OFC a partir de un lodo de un reactor SBR nitrificante/desnitrificante utilizando sustratos provenientes de restos celulares y NAG.

Conocer cuáles son los OFC que están presentes en diferentes sistemas estudiados y en particular en sistemas desnitrificantes.

Diseñar un método de T-RFLP específico para detectar la diversidad de OFC en muestras ambientales.

### **Preguntas a responder:**

¿Los OFC pueden utilizar compuestos provenientes de restos celulares en condiciones desnitrificantes o anaerobias?

¿Es posible enriquecer estos organismos utilizando compuestos similares a restos celulares?

¿Los OFC detectados por secuenciación pertenecen a un determinado género/especie o a varios?

¿Cómo se podría diseñar un método para estudiar la diversidad de este grupo en muestras de reactores?

### 3. Estrategia

Para enriquecer en organismos del filo *Chloroflexi* se realizaron enriquecimientos en medio líquido anaerobio (sin ningún aceptor de electrones) y en medio desnitrificante (con nitrato como aceptor de electrones). Se utilizó como inóculo el lodo de un reactor SBR de tratamientos de efluentes de una curtiembre, en el cual se había detectado previamente OFC. Los sustratos utilizados fueron extracto de levadura, extracto celular del mismo lodo en estudio (previamente esterilizado por autoclave) y N-Acetil Glucosamina (NAG).

Para la detección de los organismos se utilizó la técnica *FISH* utilizando dos sondas específica (CFX1223 y GNSB941) dirigida a los OFC. Se aplicó la técnica tanto en el inóculo como en muestras tomadas de los diferentes enriquecimientos.

Parte de este trabajo fue conocer cuáles eran los OFC que estaban presentes en diferentes sistemas. Para ello se analizó la comunidad bacteriana de tres bibliotecas de clones del gen ARNr de 16S obtenidos de diferentes enriquecimientos realizados anteriormente. Los enriquecimientos anaerobios analizados fueron; un sistema desnitrificante (con acetato como sustrato y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones), un sistema de cloración (con acetato como sustrato y tricloroeteno-TCE como aceptor de electrones) y otro sistema con acetato como sustrato y antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) como aceptor de electrones. Los insertos de las bibliotecas de clones de los tres enriquecimientos se amplificaron por PCR y se comprobó el tamaño de los mismos. El análisis de los amplificadores se realizó por dos estrategias. Por un lado se realizó el análisis de restricción de amplificadores (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis: ARDRA) haciendo el estudio comparativo de los geles obtenidos se seleccionaron clones que presentaban diferentes perfiles para su secuenciación (placa N1). En las placas D1 y T1 se realizó la secuenciación de 20 y 19 insertos de la población de clones de las bibliotecas sin hacer selección previa. Se comparó las secuencias obtenidas con las secuencias de la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP).

Se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias de OFC obtenidos en enriquecimientos realizados con anterioridad para encontrar si existía algún género o especie que predominara en los sistemas estudiados.

Para diseñar un método de detección de la diversidad de OFC en diferentes muestras ambientales, se recopiló información de las diferentes sondas y primers encontrados en

la bibliografía dirigidas a detectar estos microorganismos. En este análisis se determinó “in silico” a partir de secuencias obtenidas de bases de datos (RDP), cuáles serían los primers adecuados para la técnica de PCR. Para diseñar un método de discriminación de los fragmentos obtenidos en análisis de T-RFLP, se estudió también la capacidad de tres diferentes enzimas de restricción (*Msp* I, *Taq* I, y *Hha* I) de diferenciar las secuencias de los distintos géneros y especies de los OFC. Este trabajo se realizó “in silico” a partir de secuencias obtenidas de bases de datos (RDP).

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Enriquecimientos

#### Enriquecimientos realizados

##### Sustratos utilizados

Las bacterias del filo *Chloroflexi* han sido reportadas como degradadoras de carbohidratos y materiales celulares, teniendo algunas de requerimiento expreso de extracto de levadura para su crecimiento (Yamada *et al.*, 2005). Es por esta razón que se planteó el estudio de los sustratos: extracto de levadura (extract. lev), extracto celular (extract. cel.) y N-acetilglucosamina (NAG). Este último compuesto forma parte del polímero peptidoglicano que constituye la pared celular de las bacterias (Brock y Madigan, 1991). Como estos organismos fueron detectados en reactores desnitrificantes y anaerobios metanogénicos se decidió probar estas dos condiciones de crecimiento (fig. 7 y tablas 3, 4 y 5) .

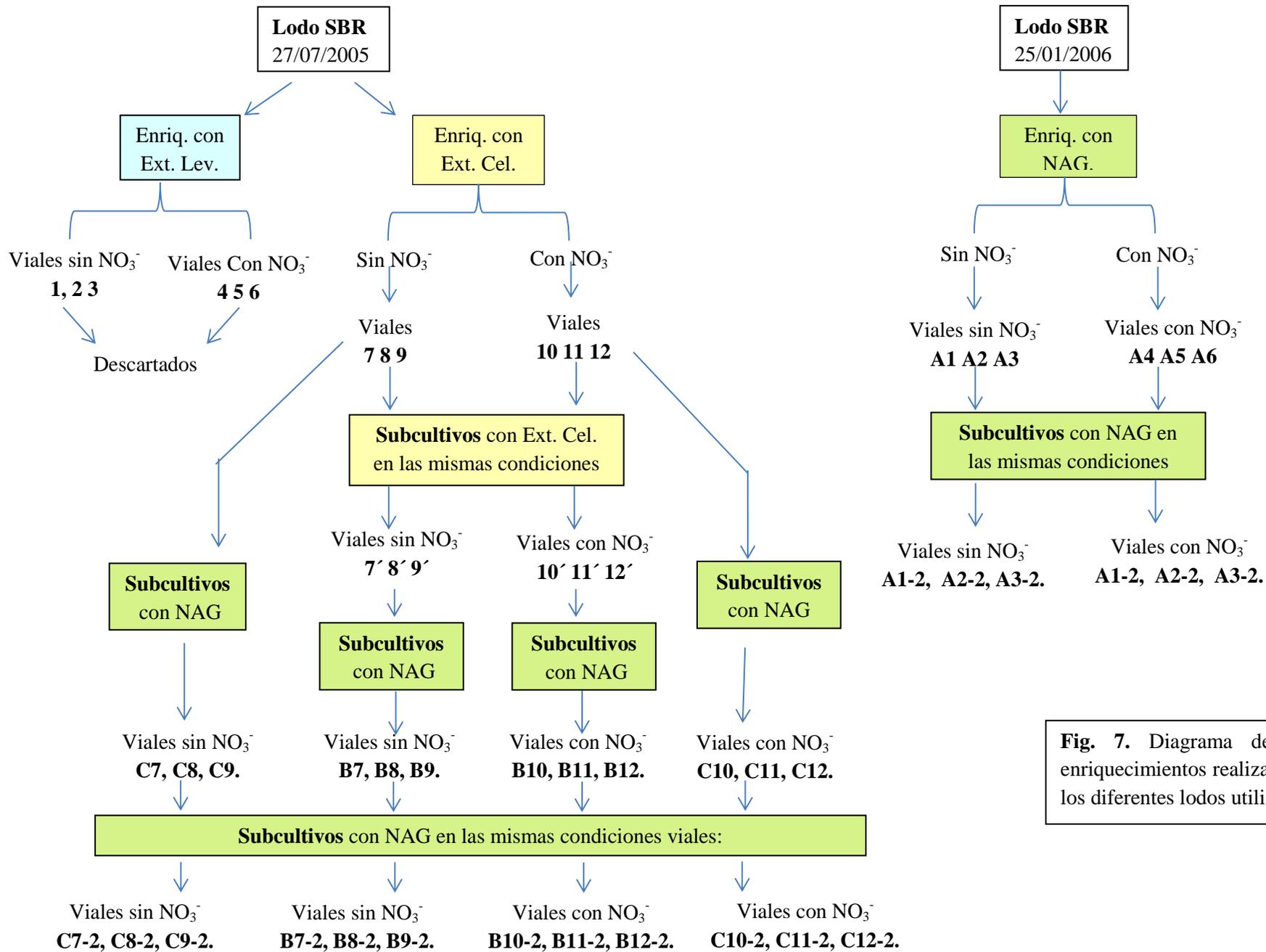
##### Medios de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de los microorganismos fue una modificación del medio mínimo de cultivo BCY (Wolin *et al.*, 1963). Dicho medio contiene por cada 500 mL;  $K_2HPO_4$  2,65 g,  $KH_2PO_4$  1,33 g, extracto de levadura 0,25 g,  $NH_4Cl$  0,50 g, solución trazas de minerales, 2,50 mL,  $Na_2S$  (25 g/L) 0,10 mL, rezarsurina al 0,2 % 0,50 mL,  $NaCl$  2,8 g. Se hirvió por 5 min para eliminar el  $O_2$ , se enfrió con agitación en baño de hielo bajo corriente de  $N_2$ , ajustando el pH a 7,0. Se repartió en viales de 120 mL con 50 mL de medio, que fueron gaseados con  $N_2$ . Se sellaron herméticamente con tapón de butilo y se esterilizaron por autoclave a 120°C y 1,1 atm por 15 min. Luego de esterilizar se agregó por filtración por cada 10 mL de medio, 0,1 mL de solución de vitaminas y 0,2 mL de solución de Ca y Mg (ver composición en Anexo 1).

##### Inóculos

Los lodos utilizados como inóculos provenían de un reactor tipo SBR de tratamiento de efluentes de una curtiembre del departamento de San José en el que previamente se habían detectado OFC.

La primera muestra de lodo fue tomada de la entrada al reactor SBR el 27.07.2005 con la que se inocularon los viales 1-6 que tenían como sustrato extracto de levadura (tabla 3) y los viales 7-12 que tenían extracto celular como sustrato (tabla 3).



**Fig. 7.** Diagrama de los enriquecimientos realizados y los diferentes lodos utilizados

A los 125 días de incubación se traspasaron a medio fresco inóculos tomados de los viales 7 al 12 que tenían extracto celular como sustrato, designándolos como viales 7' al 12' y que se dejaron de seguir los viales que tenían extracto de levadura como sustrato (viales 1-6). Esto fue debido a que presentaron un marcado crecimiento fermentativo (producción de gas y pH ácido), con el que no podrían competir los OFC de lento crecimiento (tabla 3). Los blancos realizados se esquematizan en la tabla 4.

Sustrato	Viales	Aceptor de e-	Inóculo
Extracto de Levadura	1, 2, 3	-	lodo reactor
	4, 5, 6	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo reactor
Extracto Celular	7, 8, 9	-	lodo reactor
	10, 11, 12	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo reactor
	7'	-	lodo enriq. 7
	8'	-	lodo enriq. 8
	9'	-	lodo enriq. 9
	10'	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo enriq. 10
	11'	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo enriq. 11
	12'	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo enriq 12

**Tabla 3.** Esquema de los enriquecimientos con Extracto de Levadura y Extracto Celular realizados. Los viales 7 al 12 fueron subcultivados a medio fresco luego de 125 días de incubación manteniendo las mismas condiciones de cultivo utilizadas para los enriquecimientos originales, designando a los nuevos enriquecimientos como 7' al 12' respectivamente.

Blanco	Sustrato	Aceptor de e-	Inóculo
BL 1	-	-	lodo reactor
BL 2	-	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo reactor
BL 3	extract. lev.	-	-
BL 4	extract. lev.	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
BL 5	extract. cel.	-	-
BL 6	extract. cel.	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
BL 7	-	-	lodo enriq 7
BL 8	-	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lodo enriq 10

**Tabla 4.** Esquema de los blancos realizados. La biomasa de los enriquecimientos originales 7 y 10 que tenían 125 días de incubación se utilizaron para inocular los blancos BL7 y BL 8 que se prepararon al subcultivar los enriquecimientos iniciales a medio fresco. Se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo utilizadas para los enriquecimientos originales.

Para los experimentos con NAG se hicieron tomas de la biomasa de los viales 7 al 12 y 7' al 12' con 224 días de incubación totales, a los que se designó C7 al C12 y B7 al B12 respectivamente (el lodo de los viales 7' al 12' tenía 125 días de incubación en el medio inicial y 99 días en medio fresco lo que completaba los 224 días totales de incubación). Se utilizó también una nueva muestra de lodo, designando a los viales como A1 al A6. Este nuevo lodo estudiado correspondió a una muestra de la entrada al reactor tomada el 25.01.2006.

A los 56 días de incubación con NAG de los viales A1 al A6 y C1 al C6 y 24 días de incubación con NAG de los viales B1 al B6 fueron traspasados todos los enriquecimientos a medio fresco, designándolos respectivamente viales A1-2 al A6-2, C7-2 al C12-2, y B7-2 al B12-2) (tablas 5a y 5b).

Vial	Inóculo	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Vial	Inóculo	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
A1	Lodo A	-	A1-2	Lodo A1	-
A2	Lodo A	-	A2-2	Lodo A2	-
A3	Lodo A	-	A3-2	Lodo A3	-
A4	Lodo A	X	A4-2	Lodo A4	X
A5	Lodo A	X	A5-2	Lodo A5	X
A6	Lodo A	X	A6-2	Lodo A6	X
C7	Lodo 7	-	C7-2	lodo C7	-
C8	Lodo 8	-	C8-2	lodo C8	-
C9	Lodo 9	-	C9-2	lodo C9	-
C10	Lodo 10	X	C10-2	lodo C10	X
C11	Lodo 11	X	C11-2	lodo C11	X
C12	Lodo 12	X	C12-2	lodo C12	X
B7	Lodo 7'	-	B7-2	Lodo B7	-
B8	Lodo 8'	-	B8-2	Lodo B8	-
B9	Lodo 9'	-	B9-2	Lodo B9	-
B10	Lodo 10'	X	B10-2	Lodo B10	X
B11	Lodo 11'	X	B11-2	Lodo B11	X
B12	Lodo 12'	X	B12-2	Lodo B12	X

**Tabla 5a** Esquema de los enriquecimientos con NAG y los diferentes inóculos utilizados. Lodo A; muestra de lodo de entrada al reactor del 25.01.2006. Lodos 7 al 12; biomasa de los enriquecimientos originales 7-12 que ya tenían 224 días de incubación en extracto celular. Lodo 7'-12'; biomasa de los enriquecimiento 7'-12' con extracto celular, que tenían 99 días de incubación en medio fresco y que habían sido subcultivados de los enriquecimientos originales 7 al 12. Todos los enriquecimientos en NAG fueron subcultivados a medios frescos, manteniendo las mismas concentraciones de cultivo utilizadas para los enriquecimientos originales. Los viales A1 al A6 y los C7 al C12 fueron subcultivados a medio fresco luego de 56 días de incubación con el sustrato NAG, designando a los nuevos enriquecimientos como A1-2 al A6-2, C7-2 al C12-2 respectivamente. Los viales B7 al B12 fueron subcultivados a medio fresco luego de 24 días de incubación en NAG, designando a los enriquecimientos como B7-2 al B12-2 respectivamente.

Blanco	Inóculo	NAG	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>blanc</i>	-	X	-
<i>Blanc<sub>N</sub></i>	-	X	X
B <sub>LA</sub>	Lodo A	-	-
B <sub>LA-N</sub>	Lodo A	-	X
B <sub>L7</sub>	Lodo 7	-	-
B <sub>L10-N</sub>	Lodo 10	-	X
B <sub>L7'</sub>	Lodo 7'	-	-
B <sub>L10'</sub>	Lodo 10'	-	X
BL <sub>α</sub>	-	X	-
BL <sub>αN</sub>	-	X	X
B <sub>LA1</sub>	Lodo A1	-	-
B <sub>LA4-N</sub>	Lodo A4	-	X
Blanc <sub>C2</sub>	Lodo C7	X	-
Blanc <sub>C2-N</sub>	Lodo C10	X	X
Blanc <sub>β2</sub>	Lodo B7	X	-
Blanc <sub>β2-N</sub>	Lodo B10	X	X

**Tabla 5b.** Esquema de los blancos realizados en los enriquecimientos con NAG como sustrato. Se utilizaron la biomasa de los enriquecimientos 7 y 10 para los blancos de lodo sin y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los enriquecimientos de los viales C. En los enriquecimientos de los viales B se utilizaron para los blancos de lodo sin y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a la biomasa de los viales 7' y 10' respectivamente. Al subcultivar a medio fresco se utilizaron para los blancos de lodo sin y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> respectivamente las siguientes biomásas; para los viales A, los lodos A1 y A4, para los viales C, los lodos C7 y C10, y para los viales B, los lodos B7 y B10. Se mantuvieron las mismas concentraciones de cultivo utilizadas para los enriquecimientos originales.

### Enriquecimientos con extracto de levadura y extracto celular como sustrato

Para los cálculos de concentración del extracto celular se consideró C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N como la relación existente entre los componentes de una célula y que los sólidos suspendidos volátiles eran de 3 g/L (dato suministrado por la empresa). De esta forma se determinó la cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para consumir el sustrato.

Los primeros sustratos ensayados fueron extracto de levadura (viales 1 al 6) con una concentración en los viales de 2 g/L y extracto celular del lodo en estudio esterilizado en autoclave en los viales 7 al 12, con una concentración de 0,5 mM, en los 50 mL de medio (anexo 1). Las soluciones de extracto de levadura y extracto celular se esterilizaron en autoclave a 1,1 atm por 15 min (el lodos se esterilizó más de una vez). Los ensayos y los blancos respectivos se esquematizaron en las tablas 3 y 4.

Los ensayos fueron realizados por triplicado con y sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, incubándose a 30°C. La concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue de 10 mM en los viales con extracto de levadura y de 4 mM en los de extracto celular. El consumo del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se siguió mediante detección con tirilla reactiva (Quantofix, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) y mediante el cambio del color del medio debido al cambio de color de la resurzina, provocado por la variación del potencial redox a consecuencia de la desaparición del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

En los ensayos con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se realimentó con sustrato cuando el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> agregado se consumía, y en los de sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aproximadamente cada 15 días.

A los 125 días se subcultivaron a medio fresco los viales con extracto celular designando a los nuevos viales como viales 7' al 12' y se realizaron los blancos respectivos (tablas 3 y 4).

### **Enriquecimientos con NAG**

Posteriormente se ensayó NAG como sustrato, con una concentración en los viales de 5 mM en presencia y ausencia de  $\text{NO}_3^-$ , donde este último tenía una concentración de 30 mM. Los ensayos se hicieron por triplicado, incubándose a 30°C con sus blancos respectivos (tablas 5a y 5b). En estos enriquecimientos el consumo de  $\text{NO}_3^-$  se determinó por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (anexo tabla 25e) o por tirilla reactiva (Quantofix<sup>®</sup>). Las soluciones de  $\text{NO}_3^-$  y NAG se esterilizaron por filtración con filtro estéril con un diámetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

A los 56 días de incubación de los viales A y C y a 24 días de incubación de los viales B, se subcultivaron todos los ensayos con NAG a medio fresco (designándolos como viales; A1-2 – A6-2; B7-2 – B12-2, C7-2 – C12-2 respectivamente) (tabla 5a).

Para medir la concentración de NAG primero se determinó la absorbancia a  $\lambda = 540 \text{ nm}$  en espectrofotómetro con lámpara de tungsteno (espectrofotómetro GENESYS 5) pero no se obtuvieron valores reproducibles. Finalmente se utilizó la técnica de determinación de azúcares reductores con dinitrosalicílico (DNS) por espectrofotometría (Miller, 1959) como se especifica en el anexo 1, realizando las medidas por triplicado.

### **Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**

La técnica de *FISH* se utilizó para monitorear el crecimiento de los OFC en los enriquecimientos. Para aumentar el rango de detección de microorganismos se utilizaron dos sondas a la misma vez **CFX1223** y **GNSB941** que cubren el filo *Chloroflexi* (Björnsson, *et al.*, 2002, Gich, *et al.*, 2001) (IDT Integrated DNA Technologies, Inc).

Para la fijación se centrifugaron dos volúmenes (600  $\mu\text{l}$ ) de células y se resuspendieron en un volumen de PBS 1X (300  $\mu\text{L}$ ), mezclándose luego con tres volúmenes de solución al 4% de paraformaldehído-PBS fría (900  $\mu\text{l}$ ), incubándose por 4-24 horas a 4°C. Luego se centrifugó por 10 min a 7000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en un volumen de PBS (300  $\mu\text{L}$ ). Luego de agitar con Vortex se repitió el centrifugado, resuspendiendo nuevamente el pellet en un volumen de PBS (300  $\mu\text{L}$ ). Se agregó igual volumen de etanol absoluto y se mezcló. Las muestras se conservaron a –20°C hasta ser analizadas.

En cada pocillo del portaobjetos se colocaron 10  $\mu$ L de muestra dejando secar al aire o en estufa a 55°C. Se deshidrató con tres series de tres minutos cada una de etanol al 50 %, 80 % y 96 % respectivamente, dejando secar al aire. Para la etapa de hibridación, se colocaron 10  $\mu$ L de buffer de hibridación que para 2,0 mL de buffer y las sondas utilizadas consistió en; 40  $\mu$ L Tris-HCL 1M pH 8, 360  $\mu$ L de NaCl 5 M, 700  $\mu$ L de formamida (35 %), 900  $\mu$ L de agua miliQ, 2  $\mu$ L de SDS. Se agregó 1  $\mu$ L de cada sonda (50 ng/ $\mu$ L) por pocillo, incubando de 9 min a 4 horas a 46°C, en cámara húmeda y oscuridad.

Luego se realizó un lavado con 1-2 mL de buffer de lavado a 48°C que para 50 mL contiene; 1,0 mL Tris-HCL 1M pH 8, 500  $\mu$ L EDTA 0,5 M, 700  $\mu$ L NaCl, agua MQ hasta 50 mL y 50  $\mu$ L de SDS. Se sumergió el portaobjeto en buffer de lavado a 48°C por 10 min. En este punto se agregó DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) tal que la concentración final fue de 0,025  $\mu$ g/mL. Luego se lavó el portaobjeto con agua MQ fría y en oscuridad a temperatura ambiente. Se montó el portaobjeto con 3  $\mu$ L citifluor por pocillo, se colocó el cubreobjeto para observar la muestra al microscopio de fluorescencia.

Al principio se clasificaron los acúmulos según el criterio subjetivo propuesto por Eikelboom (Eikelboom, 2000), que establece el Índice de Filamentos (IF) dentro de una escala del 0-5, dependiendo la cantidad de filamentos presentes en los acúmulos. Se utilizaron los valores intermedios de la escala, asignándole los números 3, 4 y 5 según tuvieran entre 1 a 5, 6 a 20 o más de 20 filamentos respectivamente (tabla 6). Finalmente dado las dificultades de contar los filamentos dentro de los acúmulos se tomó como método de cuantificación el % de campos positivos frente a los campos totales analizados.

Nº	característica
3	entre 1 y 5 filamentos por floculo
4	entre 5 y 20 filamentos por floculo
5	más de 20 filamentos por floculo

**Tabla 6.** Clasificación subjetiva de los acúmulos según Eikelboom, dependiendo de la cantidad de filamentos observados en ellos (Eikelboom, 2000).

### Extracción de ADN

Se tomaron muestras de la biomasa de los enriquecimientos y de los lodos. Se extrajo el ADN utilizando el kit “Ultra clean/soil DNA isolation” (MoBio) siguiendo el protocolo sugerido por el manual del kit a partir de 1,0 mL de la muestra (anexo 4).

## 4.2 Análisis de secuencias del gen ARNr 16S de OFC obtenidas de enriquecimientos previos

### Análisis de bibliotecas de genes del ARNr 16S (placas N1, D1, T1)

Se analizaron tres bibliotecas genómicas realizadas previamente por la Dra. Claudia Etchebehere en la Michigan State University de a partir de muestras de tres enriquecimientos diferentes (tabla 7).

Enriquecimientos	Placas de Clones
acetato/nitrato (anaerobio)	placa N1 LiB 16S
acetato/AQDS (anaerobio)	placa D1 16S
acetato-H <sub>2</sub> /TCE (anaerobio)	placa T1 LiB 16S

**Tabla 7.** Esquema de los tres enriquecimientos previos con los que se construyeron las bibliotecas de clones de los genes ARNr 16S. AQDS-Antraquinona-2,6-disulfonato, TCE-Tricloroetano.

El inóculo para los enriquecimientos con los que se construyeron las bibliotecas genómicas, provino de un reactor desnitrificante UASB alimentado con acetato y nitrato. A partir del ADN extraído de los enriquecimientos, se amplificó el gen del ARNr 16S por PCR convencional. Se utilizó primer universales para el dominio Bacteria, el forward 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), correspondiente a la posición 8±27 (numeración *Escherichia coli*); y el reverse 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), correspondiente a la posición 1522±1542 (IDT Integrated DNA Technologies, Inc). El producto de PCR (amplificación del gen ARNr de 16S) fue clonado utilizando el kit para el clonado TOPO TA cloning kit (Invitrogene™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos procedimientos fueron realizados por la Dra. Etchebehere.

### Amplificación por PCR del gen ARNr de 16S de los clones

En este trabajo se analizó los clones obtenidos en las bibliotecas genómicas descriptas. Se partió de cultivos de los clones obtenidos y se amplificó el inserto de cada clon. Para ello se utilizó una mezcla de reacción conteniendo para 25 µl; 2,5 µL Buffer 10x, 0,75 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,25 µL BSA, 1,25 µL dNTPs, 19,6 µL H<sub>2</sub>O, 0,25 µL primer T7, 0,25 µL primer T3, 0,125 µL *Taq* Polimerasa (Invitrogene™), en la mezcla de reacción de resuspendió parte de la colonia de cada clon. Inicialmente se llevó a 92°C durante 2 min 10 seg. Se realizaron 25 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1min). Se

realizó una extensión final de 7 min a 72°C. Se utilizaron los primer T7 cuya secuencia es 5'-TACGACTCACTATAGGGC-3', y el primer T3 cuya secuencia es 5'-TAACCCTCACTAAAGGGA-3' dirigidos a la secuencia del plásmido (IDT Integrated DNA Technologies, Inc.). Cada reacción fue luego analizada por electroforesis en gel de agarosa 0,8 % en TBE 0,5X, con un marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen). La corrida fue realizada a 100 V por 15-20 min hasta que el colorante azul de bromofenol llegara al final del gel. Cada gel fue teñido con 10 µL de Bromuro de Etidio 10 µg/µL en 200 mL de agua durante 30 min. Luego se lavó con agua, se observó con el transiluminador y se fotografió con cámara digital (Kodak digital science, EDAS 120).

### **Análisis de restricción en amplificadas de ARNr (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis: ARDRA)**

Los amplificadas obtenidos se utilizaron para el tratamiento con enzimas de restricción. Cada reacción de restricción de 30 µL contenía; BSA (20mg/mL) 0,2 µl, agua MQ 15.8 µL, Buffer C 10x 3.0 µL, *Hha* I 1,0 µL (Invitrogen), producto de PCR 10,0 µL. Cada reacción fue incubada a 37°C en baño de agua durante toda la noche o al menos durante 4 hs, y luego inactivada a 65°C durante 10 min. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de Agarosa (Methaphor) 3,5 % en TBE 1X, cargándose 20 µL de cada reacción más 3 µL de Loading buffer 6X. Se utilizó el marcadores de peso molecular N° V (Roche Gmb) La corrida se realizó a 100 V hasta que el colorante azul de bromofenol llegara al final del gel. Cada gel fue teñido con 10 µL Bromuro de Etidio 10 µg/µL en 200 mL de agua durante 30 min. Luego se lavó con agua y se observó con el transiluminador y se fotografió con cámara digital (Kodak digital science, EDAS 120). Se observaron los patrones obtenidos y los de la placa N1 fueron comparados con el software GelCompar (versión 4.2; Applied Maths 1992-1997, Kortrij, Belgium).

### **Secuenciado y análisis de secuencias**

Se secuenció el producto de PCR proveniente de;

- 10 amplificadas 1500 pb y 10 de 1000 pb de la placa D1 (tabla 19).
- 19 amplificadas de 1000 pb de la placa T1 (tabla 19).
- 19 clones de los 10 perfiles de ARDRA dominantes de la placa N1, cuyo peso molecular era de 1500 pb (tabla 20).

La secuenciación fue realizada en un analizador de genes ABI Prism 3700 (Applied Biosystem) del Genomics Technology and Support Facility de la Michigan State University. Se analizó la similitud de las secuencias obtenidas con las secuencias de la base de datos GeneBank utilizando al herramienta BLAST así como las herramientas

SEQMATCH, CLASIFIER, y TREE BUILDER del RDP (Cole *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2007).

### **Análisis filogenéticos de secuencias del gen ARNr 16S de *Chloroflexi* obtenidas en trabajos previos**

Se construyeron árboles filogenéticos del filo *Chloroflexi* con la secuencia N1 (la única secuencia del filo obtenida de la placa N1), con secuencias obtenidas previamente por la Dra Etchebehere en estudios anteriores con reactores UASB desnitrificantes (tabla 8) y con secuencias obtenidas de los lodos de un reactor SBR de tratamientos de efluentes de una curtiembre. Se utilizaron también secuencias de organismos aisladas del filo *Chloroflexi* obtenidas del banco de datos GenBank del NCBI y secuencias recuperadas con la herramienta Seqmatch del RDP. Los análisis filogenéticos y evolutivos moleculares se realizaron utilizando el programa MEGA versión 5,2 (Tamura *et al.*, 2011) y la herramienta Tree builder del RDP (Cole *et al.*, 2011).

CLON	PRIMER	Sustratos/aceptor de e <sup>-</sup>
31	<i>Bacteria</i>	lixiviados de vertedero/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
10lix	<i>Bacteria</i>	lixiviados de vertedero/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
48G	<i>Bacteria</i>	efluente de reactor metanogénico de cervecería/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
64G	<i>Bacteria</i>	efluente de reactor metanogénico de cervecería /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
58C	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
99C	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
10dhc	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
11dhc	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
T5	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
T10	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
T14	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
T20	DHC	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
H3	<i>Bacteria</i>	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + Tenso Activo
N1	<i>Bacteria</i>	Acetato/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
AO6 Bader	<i>Bacteria</i>	Muestra directa del lodo de reactor SBR de curtiembre
GO6 Bader	<i>Bacteria</i>	Muestra directa del lodo de reactor SBR de curtiembre
B12 Bader	<i>Bacteria</i>	Muestra directa del lodo de reactor SBR de curtiembre

**Tabla 8.** Cuadro con los clones obtenidos previamente de reactores UASB desnitrificantes a escala de laboratorio y de un reactor SBR, que contenían secuencias del filo *Chloroflexi*. Se indican los tipos de primers utilizados, la composición del sustrato y el aceptor de electrones. La sustancia tenso activa fue agregada porque en el reactor existían problemas de sedimentación. Los primer de *Bacteria* fueron el 27F y 1492R (Alm *et al.*, 1996), los de DHC fueron el Fp DHC1 y el Rp DHC1377 (Löffler, *et al.*, 2000).

## Análisis bioinformáticos: Estudio de cobertura de las sondas, cebadores (primers) y de enzimas de restricción para diferenciar el filo

Para poder diseñar un método de T-RFLP específico para los OFC es necesario conocer primero cuál o cuáles son los posibles primers que detectan mejor el filo. En el T-RFLP se utiliza el marcado del primer con un fluoróforo en el extremo 5' para su posterior visualización. Luego se necesita conocer cuál o cuáles enzimas de restricción permiten obtener fragmentos de longitudes diferentes al digerir los productos de PCR en estudio. Los extremos marcados con el fluoróforo de los fragmentos obtenidos, son luego separados por electroforesis y visualizados en un secuenciador automático.

### Sondas

En esta sección se recopilaron datos de las diferentes sondas que cubren el filo *Chloroflexi*, para poder diseñar un método de análisis de estos organismos. Se analizó cuáles serían los primers más adecuados para PCR para el método T-RFLP específico para el filo. Los datos de las sondas fueron obtenidos de la base de datos de probeBase (Loy, *et al.*, 2007). El análisis de las sondas se realizó con la herramienta ProbeMatch del RDP. Se compararon las sondas definidas en la bibliografía que cubren todo el filo o parte de él (tabla 9). Se seleccionó las secuencias de organismos aislados así como de organismos no cultivados del filo.

Sonda	Blanco	Largo (nt)	Secuencia	Referencia
CFX1223	filo <i>Chloroflexi</i>	1223-1242	Probe: 5' CCATGTAGCGTGTGTGTMG 3' Target: 5' CKACACACACGCTACAATGG 3'	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
GNSB941	filo <i>Chloroflexi</i>	941-957	Probe: 5'AAACCACACGCTCCGCT 3' Target: 5'AGCGGAGCGTGTGGTTT 3'	Gich <i>et al.</i> , 2001
CFX1A331	<i>Candelinae</i>	331-348	Probe: 5' CCCCCTAGGAGTCGGGAC 3' Target: 5' GTCCCGACTCCTACGGGG 3'	Yoon <i>et al.</i> , 2010
CFX784	clase <i>Anaerolineae</i>	784-801	Probe: 5' ACCGGGTCTCTAATCCC 3' Target: 5' GGGATTAGAGACCCCGGT 3'	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
CFX197	filotipos no cultivados de la clase <i>Anaerolineae</i>	197-214	Probe: 5'TCCCGGAGCGCCTGAACT 3' Target: 5'AGTTCAGGCGCTCCGGA 3'	Speirs <i>et al.</i> , 2009
GNSB633	algunos clones del subfilo I	633-652	Probe: 5'TAGCCCGCCAGTCTTGAACG 3' Target: 5'CGTTCAAGACTGGCGGGCTA 3'	Sekiguchi <i>et al.</i> , 1999
CFX109	" <i>Chloroflexi</i> "	109-126	Probe: 5'CACGTGTTCCCTAGCCGT 3' Target: 5'ACGGCTGAGGAACACGTG 3'	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
Dhe1259t	algunos <i>Dehalococcoides</i> spp.	1259-1278	Probe: 5'AGCTCCAGTTCACACTGTTG 3' Target: 5'CAACAGTGTGAACTGGAGCT 3'	Yang y Zeyer, 2003

**Tabla 9.** Esquema de las sondas analizadas. Se detallan los grupos blancos, el largo de la sonda, así como la secuencia blanco. Los detalles de las sondas están disponibles en probeBased (Loy *et al.*, 2007).

### Enzimas de restricción

Para diseñar un método de T-RFLP específico del filo y ver si existe algún patrón que sirva para diferenciar entre las familias o géneros de los OFC, se analizaron los fragmentos que se obtienen con las enzimas de restricción *Msp I*, *Taq I* y *Hha I* (tabla 10). Para ello se obtuvieron de las bases de datos del NCBI y del RDP, las secuencias completas y parciales de los genes del ARNr 16S de los organismos aislados del filo. Luego se utilizó el programa MEGA 5.2 para alinear las secuencias y buscar el sitio de unión al primer y los lugares de corte de las diferentes enzimas en las secuencias analizadas, y así determinar *in silico* el tamaño del fragmento N-terminal (se utilizó el primer general para *Bacteria 27F*). En las secuencias que no tenían el sitio de unión para el primer, se estimó el tamaño del fragmento N-terminal. Para esta estimación luego de alinear las secuencias, se ubicó la secuencia de un microorganismo en la que sí se encontrara el sitio de unión y se estimó los nucleótidos que faltaban en las secuencias sin el sitio de unión, hasta encontrar dicho sitio.

ENZIMA	RECONOCIMIENTO Y PUNTO DE CORTE	REFERENCIA
<i>Msp I</i>	C CGG	Lin <i>et al.</i> , 1989
<i>Taq I</i>	T CGA	Barany <i>et al.</i> , 1992
<i>Hha I</i>	GCG CC	Roberts <i>et al.</i> , 1976

**Tabla10.** Enzimas de restricción con sus sitios de reconocimiento y puntos de corte.

## **5. Resultados obtenidos y discusión**

### **5.1 Enriquecimientos realizados**

#### **Observación macroscópica**

El resumen de las observaciones realizadas se detalla en las tablas 11, 12a, 12b, 13a y 13b.

#### **Enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato**

Luego de 125 días de incubación se descartaron los enriquecimientos con extracto de levadura por presentar crecimiento fermentativo muy marcado con gran producción de gas y pH ácido (entre 5 y 6 determinado por tirilla reactiva). Dado que los OFC son de crecimiento muy lento, no podrían competir con las bacterias fermentativas de rápido crecimiento, por lo cual se decidió descartar estos enriquecimientos (anexo 1, tablas 26a y 26b).

#### **Enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato**

##### **Enriquecimientos sin $\text{NO}_3^-$**

##### **Viales 7 al 9**

El color del medio alternó entre verde-amarillento y gris. Se observaron lodos negros, lo que podría indicar la presencia de  $\text{S}^{-2}$  que con algo de  $\text{Fe}^{+2}$  precipita como  $\text{FeS}$ .

Con el paso de los días se observó al lodo más agregado, comenzado a observarse lodos con ciertas dificultades para precipitar a los 267 días de incubación.

A los 267 días de incubación se observó la formación de cristales en forma de agujas doradas que también se observaron en los blancos de extracto celular con y sin  $\text{NO}_3^-$ . Estos cristales estarían indicando en estos sustratos complejos la existencia de transformaciones químicas. No se observó formación de gas durante los 395 días de incubación (tablas 27a y 27e).

##### **Viales 7'al 9'**

El color del medio alternó entre verde-amarillento y gris. Se observaron lodos negro-grisáceos en los que se apreció la formación de agregados o biofilm y a los 143 días de subcultivos (267 días totales) ciertas dificultades para precipitar. Durante el tiempo de incubación no se observó en los viales ni en los blancos respectivos la presencia de cristales dorados ni de gas (anexo 1, tablas 27c y 27e).

## Enriquecimientos con $\text{NO}_3^-$

### Viales 10 al 12

El medio permaneció mayormente rosado, lo que indicó poco consumo de  $\text{NO}_3^-$ . El lodo pasó de un color grisáceo (a los 138 días de incubación) a un lodo negro (a los 192 días de incubación), observándose la formación de agregados o biofilm. Luego de 274 días de incubación se observó algo de producción de burbujas de gas que también se observó en el blanco BL6 de extracto celular y  $\text{NO}_3^-$  (anexo 1, tablas 27b y 27e).

### Viales 10'al 12'

El medio permaneció mayormente rosado, tornándose amarillo verdoso a los 67 días de subcultivado. El lodo pasó de un grisáceo a un negro amarronado a los 143 días subcultivado tornándose de color beige a los 252 días de subcultivado.

Se observó la presencia de biofilm y durante el tiempo de incubación no se observó la producción de gas.

En el blanco de lodo BL 7 (inoculado con biomasa del vial 7 que tenía 125 días de incubación) se observó la formación de biofilm y algunos grumos negros, mientras que en el blanco BL 8 de lodo y  $\text{NO}_3^-$  (inoculado con biomasa del vial 10 que tenía 125 días de incubación) no se observó la formación de biofilm pero si algunos grumos negros (anexo 1, tablas 27d y 27e).

Enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato		Observación macroscópica	Obs. por <i>FISH</i>	Consumo de nitrato	Comentarios
Medio anaerobio	viales 1, 2 y 3	Se observa abundante crecimiento, formación de gas, descenso de pH.	---	---	Se descartan por crecimiento fermentativo.
Medio anaerobio con $\text{NO}_3^-$	viales 4, 5 y 6	Abundante crecimiento, formación de gas, descenso de pH.	---	---	Se descartan por crecimiento fermentativo.

**Tabla 11.** Resumen de las observaciones macroscópicas y por *FISH* de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato en presencia y ausencia de  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones.

Enriquecimientos con Extracto de Celular como sustrato		Observación macroscópica	Observación por <i>FISH</i> (GNSB941-CFX1223)	Comentarios
Medio anaerobio	viales 7, 8 y 9	El medio alternó entre verde amarillento y gris, se observa oscurecimiento de la biomasa, formación de biofilms, dificultades para precipitar y la presencia de cristales.	Se observaron organismos filamentosos, la mayoría de ellos cortos y finos, mayormente dentro de los acúmulos.	Dificultades para cuantificar por <i>FISH</i> . En las muestras de lodo del reactor, los filamentos se veían en mayor número, más grandes y definidos que en los enriquecimientos.
	viales subcultivados 7', 8' y 9'	El medio alternó entre verde amarillento y gris, se observa oscurecimiento de la biomasa, formación de biofilms, dificultades para precipitar	Ídem. Se apreció una tendencia al aumento de los filamentos con el tiempo.	Dificultades para cuantificar por <i>FISH</i> . Se observó un mayor número de filamentos que en los enriquecimientos con $\text{NO}_3^-$ .

**Tabla 12a.** Resumen de las observaciones macroscópicas y por *FISH* de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato.



Enriquecimiento con NAG como sustrato		Observación macroscópica	Observación por <i>FISH</i>	Comentarios
Medio anaerobio	Viales A1, A2 y A3	Medio traslúcido. Se observa un color beige-grisáceo de la biomasa, y algo de producción de gas.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo los que eran muy dispersos y delgados.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i> debido a los cristales de NAG.
	Viales C7, C8 y C9	Se observa oscurecimiento de la biomasa del color gris al negro, turbidez del medio y algo de producción de gas.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo, los que eran muy dispersos y delgados.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i>
	Viales B7, B8 y B9	Se observa oscurecimiento de la biomasa del color beige al negro, y algo de producción de gas.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo los que eran muy dispersos y delgados.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i> .

**Tabla 13a.** Resumen de las observaciones macroscópicas y por *FISH* de los enriquecimientos con NAG como sustrato.

Enriquecimiento con NAG como sustrato		Observación macroscópica	Observación por <i>FISH</i>	Consumo de nitrato	Comentarios
Medio anaerobio con $\text{NO}_3^-$	Viales A4, A5 y A6	Se observa la biomasa de color beige-grisácea, con grumos marrones.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo los que eran muy dispersos y delgados.	No se detectó consumo total de nitrato y nitrito.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i>
	Viales C10, C11 y C12	Se observa poco oscurecimiento de la biomasa, y algo de producción de turbidez y gas.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo los que eran muy dispersos y delgados.	Se detectó consumo total de nitrato y nitrito.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i> .
	Viales B10, B11 y B12	Se observa la biomasa de color beige algo de turbidez del medio y producción de gas.	Se observó escasos acúmulos y un aumento en el número de filamentos del filo los que eran muy dispersos y delgados.	No se detectó consumo total de nitrato.	Dificultades para cuantificar el consumo de NAG, así como para la cuantificación por <i>FISH</i> .

**Tabla 13b.** Resumen de las observaciones macroscópicas y por *FISH* de los enriquecimientos con NAG como sustrato y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptor de electrones.

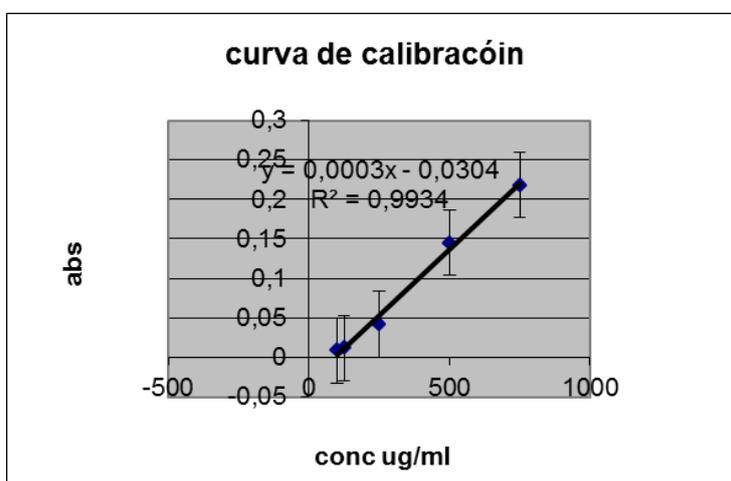
## Enriquecimientos con N-acetilglucosamina (NAG) como sustrato

### Puesta a punto para la cuantificación del NAG:

Para medir la concentración de NAG se construyó una curva de calibración midiendo la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro con lámpara de tungsteno (Genesys 5). No se obtuvieron valores reproducibles a pesar de realizarse varias medidas y por triplicado. Se decidió entonces utilizar la técnica de determinación de azúcares reductores del dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) midiendo la absorbancia a 540 nm siguiendo la técnica del protocolo adjunto (anexo 1). Se construyó la siguiente curva de calibración a partir de una solución stock de 11,06 mg/mL. La solución así como sus diluciones se prepararon y midieron el mismo día (tabla 14, fig. 8).

conc.(ug/mL)	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	Abs prom <sub>1-2</sub>
750	0,216	0,220	0,2180
500	0,145	0,145	0,1450
250	0,043	0,041	0,0420
125	0,011	0,012	0,0115
100	0,009	0,008	0,0085
50	0,003	0,000	0,0015

**Tabla 14.** Medidas de las absorbancias de las soluciones de NAG de concentración conocida, para la construcción de la curva de calibración. Las soluciones fueron preparadas y medidas en el mismo día siguiendo el método de DNS.



**Fig. 8** Curva de calibración para la determinación espectrofotométrica de la concentración de NAG por el método de DNS.

Se obtuvieron valores reproducibles en los duplicados y un buen coeficiente de correlación ( $R^2 = 0,9934$ ) en un rango de concentraciones desde 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Determinación de las concentraciones de NAG en los enriquecimientos**

Al medir las concentraciones de NAG en los viales a los 45 y 54 días de incubación se obtuvieron los valores indicados en el anexo 1 en la tabla 28a.

Si bien se observó una disminución de la concentración del NAG en todos los viales, al medir las absorbancias de los blancos de NAG y calcular sus concentraciones respectivas utilizando la curva de calibración, también se observó en ellos una disminución de la concentración de NAG (tabla 15).

Se observó al microscopio en fresco los blancos para poder determinar si había problemas de contaminación. Se constató dos problemas, por un lado algunos de los viales se contaminaron y por otro se observó un precipitado blanco en algunos de ellos.

El blanco  $BL_{\alpha N}$  (NAG y  $NO_3^-$ ) fue descartado a los 6 días de incubación por estar contaminado, lo que se constató por la presencia de gas en el vial y por observación al microscopio.

En los blancos *blanc* (NAG), *blanc<sub>N</sub>* (NAG y  $NO_3^-$ ) y  $BL_{\beta N}$  (NAG y  $NO_3^-$ ) se apreció la presencia de un precipitado blanco, a pesar que la solubilidad del NAG en agua (50 mg/mL, índice Merck 2007) está por arriba de la concentración de los viales (1,1 mg/mL). En estos blancos precipitados,  $BL_{\beta N}$  y sobre todo *blanc* y *blanc<sub>N</sub>* (que fueron los que se realizaron al comenzar los enriquecimientos), la medida de la concentración de NAG fue menor a la agregada (tabla 15). Por lo tanto la disminución en la lectura de la absorbancia en los viales (y por ende en la concentración calculada) se podría deber a la formación del precipitado y no solo a la utilización de ese sustrato por los microorganismos.

Se preparó una nueva solución de NAG (22,12 mg/mL) y se realizaron dos nuevos blancos de NAG sin y con  $NO_3^-$  ( $BL_{\beta}$  y  $BL_{\beta N}$ ) con dicha concentración y un blanco más diluido de NAG con  $NO_3^-$  ( $BL_{\gamma N}$  5,53 mg/mL) para determinar si el medio de cultivo afectaba la solubilidad del NAG.

En la tabla 15 se esquematizan los valores obtenidos para las concentraciones de NAG medidas en los distintos blancos y soluciones preparadas. Por lo observado al analizar la tabla 15, la formación del precipitado podría estar relacionado con la presencia de  $NO_3^-$ , el tiempo de incubación y/o con la concentración de NAG.

Cuando se midió una solución control de 750  $\mu$ g/mL preparada el día anterior a la medida, se observó un valor 28 % menor que lo esperado, mientras que la solución usada de la curva de calibración se preparó y midió en el momento. También se midió un blanco preparado en el momento el cual dio un valor próximo al esperado en la

curva. Esto podría sugerir que hay un efecto del tiempo sobre las soluciones de NAG que hace que no se pueda detectar su consumo con el método aplicado.

El otro problema fue la contaminación de las soluciones y blancos de NAG (tabla 16). Se descartó que la contaminación de los blancos proviniera de la solución de  $\text{NO}_3^-$  ya que no se detectó contaminación al observar al microscopio una muestra de esta solución. Al observar al microscopio la solución stock de NAG (que tenía 13 días de preparada) se observó la presencia de microorganismos. Dichos microorganismos podrían provenir de la propia solución de NAG debido a los métodos de obtención biotecnológicos (Chen *et al.*, 2010, Rao *et al.*, 2000, Rao *et al.*, 2005), ya que las soluciones presentaban rápidamente evidencias de contaminación a pesar de haber sido filtradas. La degradación del NAG por parte de estos microorganismos contaminantes podría a su vez incidir en la disminución de dicha concentración en los blancos.

Por lo tanto en base a las observaciones hechas en los blancos, no se puede afirmar que las medidas de las concentraciones NAG obtenidas en los viales, fueran debidas al consumo de este sustrato por los microorganismos del inóculo.

Blancos	Conc. de NAG medida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. de NAG inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	$t_{\text{inc.}}$ (días)	Observación macroscópica
<i>Blanc</i>	126	993	64	Incoloro c/precipitado
<i>blanc<sub>N</sub> c/NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	128	958	64	Rosado c/precipitado blanco
BL <sub><math>\alpha</math></sub>	890	993	7	Rosado intenso
BL <sub><math>\beta</math></sub>	881	993	1	Rosado intenso
BL <sub><math>\beta</math>N</sub> (c/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	648	958	1	Incoloro c/precipitado
BL <sub><math>\gamma</math>N</sub> (c/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	458	479	1	Rosado s/ precipitado
Sol. control 750 $\mu\text{g/mL}$	538	750	(1)	
Blanco (s/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <sub>t=0</sub>	1007	993	0	

**Tabla 15.** Comparación de las concentraciones de NAG en los blancos. Conc. de NAG medida: concentración promedio calculada partir de la curva de calibración. Conc. de NAG esperada: concentración esperada a partir de la cantidad de NAG utilizada. Se detallan los días de incubación y la observación macroscópica de los mismos. La composición de cada blanco se detalla en la tabla 5b. (1) 1 día de preparada la solución, no es un blanco por lo que este tiempo no es un tiempo de incubación.

Blanco	NAG (mg/mL)	t <sub>inc.</sub> (días)	Observación microscópica
<i>blanc</i>	11,06	76	No se observan microorganismos, si cristales
<i>blanc<sub>N</sub> c/NO<sub>3</sub></i>	11,06	76	Se observan bastones delgados
BL <sub>α</sub>	11,06	19	Se observan microorganismos
BL <sub>αN</sub>	11,06	6	Se observan microorganismos
BL <sub>β</sub>	22,12	13	Se observan bastones delgados
BL <sub>βN</sub> c/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	22,12	13	Se observan microorganismos
BL <sub>γN</sub> c/NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,53	13	Se observan bastones delgados y filamentos
Sol NAG	11,06	13	Se observan microorganismos

**Tabla 16.** Observación microscópica de blancos de NAG con diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación.

Se probaron varios métodos para evitar la formación del precipitado y la contaminación de la solución de NAG y así poder poner a punto la técnica para la determinación del NAG consumido en los enriquecimientos. A continuación se detallan los cinco métodos testados.

**1-**Ya que el NAG precipita a pH alcalino (como cristales o flóculos), se probó acidificar hasta pH 5 e incubar para ver si se disociaban los cristales (aunque este pH no fuera adecuado para el crecimiento de los microorganismos). Se tomaron 5,0 mL de un blanco de NAG precipitado y se acidificó con ácido fosfórico 0,1 M. Al observar al microscopio los cristales persistían.

**2-**Se preparó una nueva solución de NAG y se prepararon blancos menos concentrados de 5, 10, 15 y 20 µg/mL, en presencia y ausencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, dado que existen trabajos en los que se utilizó una concentración de NAG de 88 µM (20 µg/mL) (Kindaichi *et al.*, 2004). Debido a que se estaba trabajando por debajo de los valores de detección de la curva de calibración, no se pudieron determinar su concentración por el método de DNS. Al observarlas al microscopio en fresco o con tinción de cristal violeta luego de un día de preparadas, se observó que presentaban algunos pocos cristales.

**3-**Se probó disolver los cristales por tratamiento con ultrasonido, sometiendo soluciones de 11,06 µg/mL a este proceso. En una solución se aplicó un tratamiento de 1 min con pulsos cada 1 seg. y en otra uno de 2 min con pulsos cada ½ seg. Al observarlas al microscopio ambas soluciones presentaron cristales.

**4-**Se prepararon blancos con y sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilizando soluciones más diluidas de NAG preparándolas en el momento y filtradas dos veces, una vez al preparar la solución y la

otra al inocular. Las concentraciones utilizadas fueron de 553  $\mu\text{g/mL}$ , 221,2  $\mu\text{g/mL}$  y 22,12  $\mu\text{g/mL}$ . Se observaron el día posterior a su preparación obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 17.

En ninguna de las soluciones doblemente filtradas se observó contaminación. En presencia de  $\text{NO}_3^-$  se observaron cristales más grandes, mientras que en su ausencia se observaron cristales pequeños, los que dejaron de observarse en bajas concentraciones de NAG (22,12  $\mu\text{g/mL}$ ).

**5-**Para tener una perspectiva a futuro se estudió la posibilidad de utilizar la esterilización por autoclave de la solución de NAG. Como la precipitación podría ser causada por una enzima, la esterilización de la solución de NAG por autoclave desnaturaría dicha enzima. Por otro lado, se podría evitar la contaminación de la solución, si es que la fuente de dicha contaminación estuviera en la propia solución. Sin embargo, este procedimiento de esterilización podría provocar la caramelización de la solución de NAG, debido a las condiciones a las que sería sometida. Para determinar si la esterilización por autoclave podría ser utilizada como una posible solución a los problemas de precipitación y/o contaminación de la solución de NAG, se esterilizó por autoclave una solución de 62,5 mM comprobándose que dicha solución no se caramelizaba.

NAG ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{NO}_3^-$ (30 mM)	Observación al microscopio en fresco
553	+	cristales grandes y pequeños s/contaminar
553	-	cristales pequeños s/contaminar
221.2	+	cristales grandes y pequeños s/contaminar
221.2	-	cristales pequeños s/contaminar
22.12	+	Sin cristales s/contaminar
22.12	-	Sin cristales s/contaminar

**Tabla 17.** Blancos de NAG de diferentes concentraciones en presencia y ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . Se observaron el día siguiente a su preparación.

## Resultados obtenidos por la técnica de *FISH*

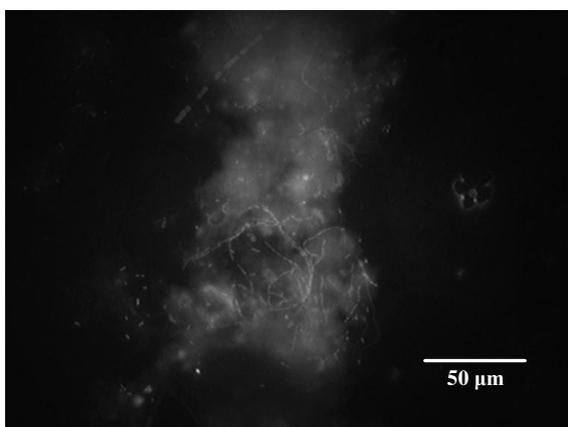
En general las sondas CFX1223 y GNSB941 dirigidas al filo *Chloroflexi* se hibridaron con organismos de morfología filamentosa que fueron muy difíciles de cuantificar dado que se encontraban dentro de los acúmulos del lodo y su distribución no era homogénea. Se planteó inicialmente la clasificación de los campos observados según el índice de

filamentos de Eikelboom (Eikelboom, 2000). Se utilizaron los valores intermedios de la escala, asignándole los números 3, 4 y 5 según tuvieran entre 1 a 5, 6 a 20 o más de 20 filamentos por campo respectivamente (tabla 6). Con esta clasificación se observaron tres de las muestras (tabla 18a).

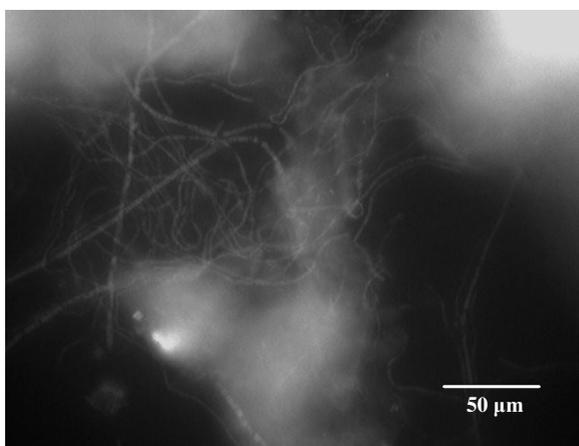
Finalmente debido a la dificultad de determinar el número de filamentos a cuantificar se optó por establecer la relación de los campos positivos con filamentos frente a los campos totales observados (tabla 18b y 18c). Esto dado que era muy difícil o imposible contar los filamentos dentro de los acúmulos (determinar la cantidad de filamentos presentes por campo) (fig. 10), así como saber si los filamentos pequeños se trataban de filamentos fragmentados o no (fragmentados por ejemplo durante la manipulación) (fig. 9).

### **Enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato**

Al observar por esta técnica muestras de lodo de los enriquecimientos originales (viales 7 al 12) con 65 días de incubación se observó pocos filamentos largos, unos cuantos intermedios y la mayoría eran finos y cortos (fig. 9). Mientras que en las muestras de lodo del reactor los filamentos se veían más grandes y definidos que en los enriquecimientos (fig. 10).



**Fig. 9.** Microfotografía de una muestra tomada del enriquecimiento 12 en medio de cultivo suplementado con Extracto Celular y  $\text{NO}_3^-$  a los 65 días de incubación. Se utilizó la técnica de *FISH* descrita con las sondas CFX 1223 y GNSB-941.



**Fig. 10.** Microfotografía de una muestra de lodo de entrada al reactor del 11.12.2005. Se utilizó la técnica de *FISH* descrita con las sondas CFX 1223 y GNSB-941.

En las tres fechas comparadas se aprecia que los enriquecimientos 7' sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup> tuvieron mayor porcentaje de campos positivos que los 10' con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (tablas 18b y 18c).

A su vez el enriquecimiento 10 original con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a los 65 días de incubación tenía mayor porcentaje de filamentos (16,5 %) que el 10' con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,5 %), a los 22 días de subcultivos ( vial que fue inoculado con el enriquecimiento 10 original).

Al cambiar de aguja por una de mayor calibre (18G11/2) se aumentó considerablemente la detección de filamentos en comparación al bajo aumento que se venía observando, pasando de un 6,9 a un 19,2 % de campos positivos (tablas 18b y 18c).

t <sub>inc tot.</sub> (días)	vial	camp. c/ 3	% de 3	camp. c/ 4	% de 4	camp. c/5	% de 5	camp.tot.
65	10	15	4,4	9	2,6	32	9,41	340
165	10'	12	3,2	14	3,7	0	0,00	379
224	* 10'	28	7,6	13	3,5	30	8,13	369

**Tabla 18a.** Cuantificación de OFC detectados por el método de *FISH* en los viales con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> indicados, utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941. Los tiempos de incubación totales para el vial 10', corresponden a los primeros 125 días de incubación en el medio inicial, más los días de incubación en el medio fresco. Se utilizó la cuantificación de cantidad de microorganismos según tabla 5. % de 3, % de 4, % de 5; porcentajes de campos con clasificación 3, 4, y 5 respectivamente. \* vial en que la muestra para el *FISH* fue extraída con aguja de mayor calibre.

t <sub>inc tot.</sub> (días)	vial	Camp. tot.	Camp. positivos	% posit.
65	10	340	56	16,5
147	10'	363	20	5,5
165	10'	379	26	6,9
224	10' *	369	71	19,2

**Tabla 18b.** Cuantificación de OFC detectados por el método de *FISH* utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941 en los viales indicados con Extracto Celular como sustrato y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Los tiempo de incubación totales para el vial 10', corresponden a los 125 días de incubación en el medio inicial, más los días de incubación en el medio fresco. Se cuantificaron los filamentos según la relación de porcentajes de campos positivos frente a los campos totales. Camp. tot.: campos totales observados. Camp. positivos: campos con filamentos observados. % posit.: % de campos positivos. \* vial en que la muestra para *FISH* fue extraída con aguja de mayor calibre.

t <sub>inc tot.</sub> (días)	vial	Camp. tot.	Camp. positivos	% posit.
147	7'	530	72	13,6
165	7'	418	78	18,7
224	7' *	391	116	29,7

**Tabla 18c.** Cuantificación de OFC detectados por el método de *FISH* en los viales subcultivos 7' con Extracto Celular como sustrato y sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, utilizando las sondas CFX1223 y GNSB941. Los tiempo de incubación totales para el vial 7', corresponden a los 125 días de incubación en el medio inicial más los días de incubación en el medio fresco. Se utilizó la cuantificación de % de campos positivos frente a los totales. Camp. tot.: campos totales observados. Camp. positivos: campos con filamentos observados. % posit.: % de campos positivos. \* vial en que la muestra para *FISH* fue extraída con aguja de mayor calibre.

### **Enriquecimientos con NAG como sustrato**

Al observar mediante *FISH* muestras de los enriquecimientos A, B y C a los 59, 31 y 59 días de incubación con NAG respectivamente, se observó que tenían muy pocas células, escasos acúmulos y algunos escasos filamentos muy dispersos y delgados que no se podían ver bien por la gran cantidad de cristales.

Debido a los problemas en la cuantificación y contaminación del NAG, así como a las dificultades en la observación por *FISH*, no se continuó aplicando esta técnica en el estudio de los enriquecimientos con este sustrato. Sin embargo al observar al microscopio utilizando la tinción con cristal violeta los enriquecimientos A y C subcultivados (inoculados con los lodos de los enriquecimientos de NAG originales) a los 180 días totales de incubación, se pudo observar la presencia de filamentos en todos los enriquecimientos. En los viales sin  $\text{NO}_3^-$  se observaron menos cristales y mayor cantidad de filamentos muy largos, y de largo intermedio y cortos. Hay que tener en cuenta que estos filamentos no se pudieron asignar al filo *Chloroflexi* porque no se realizó la hibridación específica.

Al observar nuevamente por *FISH* muestras de los enriquecimientos originales A1, C7 (cuando tenían 230) y B7 (con 202) días de incubación con NAG, se observó la presencia de un número mayor de filamentos. Se decidió entonces hacer más extracción de ADN y fijar muestras para *FISH* para futuros análisis tanto de los viales originales A1, C7, y B7, como también los enriquecimientos subcultivados (anexo 1, tabla 28d).

## **DISCUSIÓN**

### **Enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato**

Al observar los blancos sin  $\text{NO}_3^-$  se detectaron cristales en forma de aguja que sugieren que hubo transformaciones químicas de sustratos complejos. Estos cristales también se observaron en los viales de los enriquecimientos sin  $\text{NO}_3^-$ .

En cuanto a la técnica de *FISH* no se realizaron medidas por duplicado debido a los bajos recuentos de filamentos que se obtuvieron y a las dificultades en la observación. Por lo tanto hay que considerar el error que puede existir en los resultados. Otro error a considerar en la técnica es la heterogeneidad de la muestra ya que la presencia de acúmulos dificultaba una toma reproducible y representativa.

A pesar de estas dificultades en la aplicación de la técnica de *FISH* podemos decir que:

**1-** Los viales sin el agregado de  $\text{NO}_3^-$  tuvieron un mayor porcentaje de OFC que los que tenían  $\text{NO}_3^-$  (tablas 18b y 18c). El resultado obtenido en los viales no se contradice con

la bibliografía, ya que ésta afirma que la mayoría de los OFC recuperados de los sistemas de tratamientos de efluentes pertenecen al subfilo 1, fundamentalmente a la clase *Anaerolineae* y los organismos aislados de esta clase no utilizan  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones (la clase *Anaerolineae* constituye entre el 65-70 % de las secuencias del filo depositadas en el RDP) (Yamada y Sekiguchi, 2009, Yamada *et al.*, 2006, Sekiguchi *et al.*, 2003). Por lo tanto, en los enriquecimientos se esperaría recuperar dentro de los OFC una mayoría de filamentos de la clase *Anaerolineae* que no utilizan  $\text{NO}_3^-$ . Se podría esperar entonces que en los enriquecimientos sin ese aceptor de  $e^-$ , se viera favorecido su crecimiento por tener menos competencia (al no favorecerse el crecimiento de los organismos que sí utilizan el  $\text{NO}_3^-$ ).

2-En las muestras de lodo tomadas directamente del reactor, los filamentos se vieron más grandes y definidos que en los lodos de los enriquecimientos (fig. 9 y 10).

-El enriquecimiento 10 inicial (con  $\text{NO}_3^-$ ) tenía mayor porcentaje de filamentos que el vial subcultivado 10' (con  $\text{NO}_3^-$ ), que fue inoculado con el lodo del vial 10 inicial luego de 125 días de incubación.

-Cuando se observaron los enriquecimientos subcultivados, se vieron filamentos más delgados y cortos que los filamentos observados en los enriquecimientos de los que habían sido inoculados.

Estas tres observaciones pueden ser debidas a que los OFC necesiten establecer un equilibrio con la comunidad microbiana para poder crecer. En el reactor ya estaba el ecosistema establecido con ciertas condiciones de crecimiento. Dado que los OFC son de lento crecimiento (Sekiguchi *et al.*, 2001, Sekiguchi *et al.*, 2003), en los subcultivos tendrían que nuevamente establecer su equilibrio para poder crecer. Esto concordaría con las características morfológicas observadas en los filamentos de los enriquecimientos en comparación con las observadas en los lodos del reactor (fig. 9 y 10).

Esta observación estaría de acuerdo con la bibliografía que señala que en las comunidades microbianas de los gránulos de reactores anaeróbicos donde se ha reportado la presencia de OFC, existe la necesidad de formar consorcios microbianos para completar las vías metabólicas necesarias para el crecimiento de la comunidad. Ya sea para degradar o transformar sustratos del medio, o para desplazar reacciones químicas termodinámicamente desfavorables (Sekiguchi *et al.*, 2003, Shigematsu *et al.*, 2003, Siggins *et al.*, 2012). Ya ha sido señalada la necesidad de sintrofismo de algunos de los organismos del subfilo 1 productores de  $\text{H}_2$ , con microorganismos consumidores

de H<sub>2</sub>, dado que la acumulación de este gas estanca su crecimiento (Sekiguchi *et al.*, 2003, Yamada y Sekiguchi, 2009). En este punto es de considerar que en los viales 10, 11, y 12 originales con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a los 273 días de incubación se observó la producción de algo de gas aunque no se determinó de que gas se trataba y que en estos enriquecimientos con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se observaron al microscopio menos filamentos que en los enriquecimientos que no tenían NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Por lo tanto, una razón para el bajo recuento de filamentos podría ser que no se hubiera aún establecido el equilibrio necesario para su crecimiento o que las condiciones de los cultivos no permitieran este equilibrio, por ejemplo por el estancamiento con el H<sub>2</sub>. ¿Tendrán la mayoría de los OFC (sobre todo las de la clase *Anaerolinea*) las enzimas necesarias para crecer aislada sostenidamente o necesitaran asociarse con otras bacterias para mantener un crecimiento sostenido? En los enriquecimientos reportados en la bibliografía, en muy pocos casos alcanzan el 40% de la comunidad en los diferentes reactores estudiados, y esos porcentajes más altos se obtienen en reactores metanogénicos, lo que podría estar indicando su necesidad de un “seudo-sintrofismo” (Yamada y Sekiguchi, 2009).

Otra razón para el bajo recuento de los OFC podría ser que se estuviera subestimando los microorganismos del filo. Esto podría ser por el muestreo, porque no se estuviera obteniendo una hibridación eficiente con las sondas o por la metodología de la hibridación utilizada.

**3-**Los datos de *FISH*, muestran un lento aumento de los OFC con el paso del tiempo, tanto en los enriquecimientos con extracto celular con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (tablas 18a, 18b y 18c). Esto apoyaría la hipótesis planteada que son degradadores de detritus celulares y estaría de acuerdo con la bibliografía (Yamada y Sekiguchi, 2009). Sin embargo, este dato no puede tomarse como concluyente, hay que tener en cuenta que no se determinó el error en los datos de *FISH* y que se ha reportado que esta técnica puede llegar a tener un error entre el 10 y el 50 % (Cabezas, 2005). A su vez, las diferencias entre los porcentajes en las tres fechas estudiadas es muy pequeña y solo se hace significativa cuando se aumenta el calibre de la aguja con la que se hace la extracción de la muestra. Por lo que, para verificar la tendencia observada de un aumento de los OFC en los enriquecimientos, habría que observar otras muestras fijadas para *FISH*, utilizando una aguja de calibre 18G11/2 para aumentar las probabilidades de detectar los filamentos.

### **Enriquecimientos con NAG como sustrato**

Al medir las concentraciones de NAG en los blancos se evidenciaron dos problemas: por un lado se detectaron problemas de precipitación y por otro de contaminación. Esta precipitación no solo dificultó la medida, sino que también disminuyó el sustrato disponible para los microorganismos.

Los problemas de precipitación y contaminación de las soluciones de NAG aumentaron con el correr de los días.

Los valores de las medidas de absorbancia en las soluciones de NAG fueron diferentes si estas soluciones se preparan y se miden en el día, a si se difieren en el tiempo. Por otro lado la medida de las concentraciones de NAG en los blancos disminuyó con la presencia de precipitados y con el aumento en el tiempo de incubación.

Otra causa que parece influir en la precipitación de las soluciones es la concentración. Esta cristalización parece disminuir en ausencia de  $\text{NO}_3^-$  y si se trabaja a concentraciones de alrededor de 20  $\mu\text{g/mL}$ , aunque estas bajas concentraciones no se puedan cuantificar con la curva calibración construida por el método del DNS utilizado. A su vez, cuando se observó al microscopio un fresco de muestras tomadas de blancos preparados con estas soluciones de alrededor de 20  $\mu\text{g/mL}$  que además fueron doblemente filtradas (se filtraron al preparar la solución y al inocular los blancos), se dejaron de observar los cristales.

Una posible explicación de esta precipitación podría ser que las impurezas que tiene el NAG por su método de obtención a partir de la quitina, formen flóculos a pH alcalinos que ayuden a la cristalización (Chen *et al.*, 2010, Rao *et al.*, 2000, Rao *et al.*, 2005). El doble filtrado podría entonces disminuir estas impurezas en las soluciones diluidas, y evitar la cristalización. Tampoco funcionó el método de acidificar la solución llevándola a pH 5 (aunque este pH no fuera viable para el crecimiento los microorganismos), ya que aun cuando se acidificó la solución, se observaron los cristales.

Otro problema que se planteó con las soluciones de NAG fue la rápida evidencia de contaminación que presentaban tanto las soluciones como los blancos. Con el método de la doble filtración al observar al microscopio un fresco de muestras de estas soluciones, luego de un día de preparadas no se observó contaminación en las mismas.

En busca de una perspectiva para solucionar estos problemas se estudió la posibilidad de esterilizar por autoclave la solución de NAG. Con esto se podría atacar dos puntas del problema: por un lado se eliminaría la contaminación de la solución, si es que esta

provenía del propio método biotecnológico de obtención del NAG, por otro lado si la precipitación fuera causada por la acción de alguna enzima, este proceso la desnaturalizaría. Para determinar si la esterilización por autoclave podría ser estudiada como una posible solución en el futuro a los problemas de precipitación y/o contaminación de la solución de NAG, se esterilizó por autoclave una solución de 62,5 mM comprobándose que dicha solución no se caramelizaba. Por lo tanto, la esterilización por autoclave es una alternativa posible para solucionar los problemas de contaminación de las soluciones de NAG.

## **5.2 Análisis de secuencias de bibliotecas obtenidas de enriquecimientos previos**

### **Bibliotecas de clones de enriquecimientos N1, D1, y T1**

Se amplificó por PCR el inserto de cada clon y se comprobó su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa (se esperaba un inserto de 1500 pb). Los clones de la placa D1 presentaban insertos de tamaño 1000 y 1500 pb. En la placa T1 la gran mayoría tenían el inserto de 1000 pb y en la placa N1 todos tenían el inserto esperado de 1500 pb (anexo 2 fig. 17).

Como primer selección se realizó sobre algunos de los amplificados un tratamiento con la enzima de restricción *Hha* I (ARDRA) y se analizaron los diferentes perfiles de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa. En la placa N1 se encontraron 10 perfiles diferentes en los 96 clones analizados (anexo 2 fig. 18). En los 33 clones analizados de D1 se observaron al menos 3 perfiles, mientras que en los 8 clones analizados de T1 se observaron 2 perfiles diferentes. En los perfiles de ARDRA de la placa N1 se realizó el análisis con el programa GelCompar versión 4.2 construyéndose dendogramas de agrupaciones de las muestras con el mismo programa (anexo 2 fig. 19). Se secuenció el producto de PCR de algunos clones representativos de cada biblioteca en el Centro de Secuenciación de la Michigan State University. Se analizó la similitud de las secuencias de los clones con las secuencias depositadas en las bases de datos GeneBank (NCBI) mediante el buscador Blast y el SEQMATCH del proyecto RDP de la Michigan State University. Se eligieron para secuenciar 10 clones de la placa D1, con insertos de 1000 pb y 10 clones de 1500 pb. De la placa T1 se analizaron 19 clones con insertos de 1000 pb, mientras que de la placa N1 se eligieron 19 clones de los 10 diferentes perfiles encontrados. En las tablas 19 y 20 se detallan los clones estudiados.

Placa de clones	Tamaño del inserto (pb)	Número del clon
D1	1000	23, 34, 39, 52, 54, 65, 72, 77, 83, 87
	1500	10, 11, 21, 24, 25, 26, 40, 45, 47, 60
T1	1000	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 17, 19, 31, 33, 35, 36, 39, 40, 41, 42

**Tabla 19.** Esquema de los clones elegidos al azar de las placas D1 y T1 cuyos insertos fueron secuenciados.

Perfil	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
N° del clon secuenciado	1	2, 27, 59	6, 7, 45, 56	4	12, 54	61, 64	37, 44	14, 28	19	20, 27

**Tabla 20.** Esquema de los clones secuenciados de la placa N1 con inserto de 1500 pb. Se eligieron para secuenciar representantes de los 10 diferentes perfiles encontrados en el análisis con la enzima de restricción *Hha* I.

### Análisis de las secuencias

Los datos obtenidos al analizar las secuencias utilizando la herramienta SEQMATCH del RDP, se muestran en las tablas 21a, 21b, y 21c.

Los filo *β-Proteobacteria* (género *Desulfomicrobium*) *Bacteriodetes*, *Tenericutes* y *Chloroflexi* solo se encontraron en la placa N1. El filo *Firmicutes* se repitió en las placas N1, D1 y T1. Mientras que los filo *Synergistetes* y *Chlorobi* solo aparecen en las placas T1 y D1 respectivamente. En la figura 11 se muestra el árbol filogenético construido con la herramienta TREE BUILDER del RDP con las secuencias de las placas N1, D1 y T1, junto con secuencias recuperadas del RDP.

### Placa N1

Las secuencias pertenecieron al Dominio *Bacteria* y se clasificaban en 5 filos diferentes (tabla 21a).

Una de las secuencias se afilió al filo *Chloroflexi* con un bajo umbral de confianza (71 %) dentro de la familia *Anaerolieaceae*. Once de las secuencias afiliaron al filo *Proteobacteria* perteneciendo a los géneros *Azoarcus*, *Thiobacillus*, *Thauera*, *Desulfomicrobium* y *Geoalkalibacter*. La secuencia del clon que afilió dentro del filo *Bacteriodetes* que se pudo clasificar, pertenecía a la familia *Cryomorphaceae*, los tres restantes daban bajos umbrales de confianza dentro de las familias *Prolixibacter* y *Owenweeksia*. La secuencia del filo *Firmicutes* se clasificó dentro del género

*Vulcanibacillus*, mientras que las 2 secuencias del filo *Tenericutes* clasificaron dentro del género *Acheloplasma*.

### Placa D1

Se detectaron 2 tipos de secuencias diferentes en los 5 clones analizados, ya que 5 de ellos dieron secuencias de mala calidad o con bajos porcentajes de homología. Varias de las secuencias agruparon junto a las de la placa T1. Tres fueron similares a secuencias del género *Vulcanibacillus* perteneciente al filo *Firmicutes* y 2 al género *Ignavibacterium* del filo *Chlorobi* (tabla 21b).

### Placa T1

Tres de las secuencias fueron de mala calidad. Tres de las secuencias con buena calidad clasificaron dentro del Dominio *Bacteria* pero no se pudo discriminar el filo al que pertenecían. Por lo tanto estas 6 fueron descartadas. El resto de las secuencias se clasificaron dentro de los filos *Synergistetes* (dentro de los géneros *Aminobacterium* y *Thermovirga*) y *Firmicutes* (dentro del género *Vulcanibacillus*) (tabla 21c).

Filo	cantidad de clones	N° de los clones	%	Familia	Género
<i>Chloroflexi</i>	1	1	---	---	---
<i>β-Proteobacteria</i>	9	2, 27, 37, 59, 61, 64, 44	100	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>
		54	97	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azoarcus</i>
		12	100	<i>Hydrogenophilaceae</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>δ-Proteobacteria</i>	2	14	100	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Geokalkibacter</i>
		28	100	<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium</i>
<i>Bacteroidetes</i>	4	6, 7, 45	---	---	---
		56	95	<i>Cryomorphaceae</i>	---
<i>Firmicutes</i>	1	20	99	<i>Bacillaceae</i>	<i>Vulcanibacillus</i>
<i>Tenericutes</i>	2	4, 19	100	<i>Achleplasmataceae</i>	<i>Acheloplasma</i>

**Tabla 21a.** Familias y géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones obtenidos a partir de la **placa N1**. Se tomó como umbral de confianza aceptable para la clasificación dentro de cada filo un valor del 95 % o superior. %: umbral de confianza de pertenecer a la familia indicada. En el caso de analizarse más de una secuencia por filo, se indica la secuencia de menor %. Se utilizó la herramienta SEQMATCH del RDP.

Filo	cantidad de clones	N° de los clones	%	Género
<i>Firmicutes</i>	3	52, 54, 60	95	<i>Vulcanibacillus</i>
" <i>Chlorobi</i> "	2	45, 47	100	<i>Ignavibacterium</i>

**Tabla 21b.** Géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones analizados obtenidos a partir de la **placa D1**. Se tomó como umbral de confianza aceptable para la clasificación dentro de cada filo un valor del 95 % o superior. %: umbral de confianza de pertenecer al género indicado. En el caso de analizarse más de una secuencia por filo, se indica la secuencia de menor %. Se utilizó la herramienta SEQMATCH del RDP.

Filo	cantidad de clones	N° de los clones	%	Familia	%	Género
<i>Firmicutes</i>	8	1, 4, 6, 9, 31, 33, 39, 42	98	<i>Bacillaceae</i>	97	<i>Vulcanibacillus</i>
<i>Synergistetes</i>	5	5	100	<i>Synergistaceae</i>	99	<i>Thermovirga</i>
		7, 8, 36, 40			---	---

**Tabla 21c.** Géneros en los cuáles clasificaron las secuencias de los clones analizados obtenidos a partir de la **placa T1**. Se tomó como umbral de confianza aceptable para la clasificación dentro de cada filo un valor del 95 % o superior. %: umbral de confianza de pertenecer a la familia y genero indicad. En el caso de analizarse más de una secuencia por filo, se indica la secuencia de menor %. Se utilizó la herramienta SEQMATCH del RDP.

## DISCUSIÓN

### Análisis de las secuencias de clones obtenidos de enriquecimientos previos

Solo en el enriquecimiento con acetato/nitrato (placa N1) se detectó una única secuencia afiliada al filo *Chloroflexi*. Por lo tanto los enriquecimientos no seleccionaron los OFC en las condiciones ensayadas, o estos organismos no fueron detectados por el método empleado.

Lo primero a destacar es que por estudios previos, se sabía de la presencia de estas bacterias en el reactor (se habían detectado secuencias del filo en el lodo en estudio), razón por la cual se planteó su análisis para entender su función en dicha comunidad bacteriana. Se conocía poco del filo y el aumento de estos microorganismos en los reactores se asociaba con problemas de sedimentación (Sekiguchi *et al.*, 2001).

Cabe preguntarse por qué no se obtuvieron secuencias de OFC en los demás enriquecimientos.

Una razón para no encontrarlas en las demás placas podría ser que en N1 fue en la única placa que se hizo una selección previa de los clones por ARDRA, encontrándose 10 perfiles diferentes en los 96 clones analizados. Luego se eligieron para secuenciar representantes de los 10 diferentes perfiles encontrados. En solo uno (que además ese perfil contenía una única secuencia) de los 10 perfiles analizados la secuencia se agrupó dentro del filo *Chloroflexi*. Mientras que en las demás placas se tomaron secuencias de clones al azar sin una selección previa. Por lo que la probabilidad de detectarlos si estaban en baja proporción era mucho menor.

Es de destacar la baja predominancia de los OFC en el enriquecimiento N1, ya que en los 96 clones estudiados solo uno tenía en inserto cuya secuencia se clasificó en este filo.

Esto puede relacionarse con varios factores. Por un lado debido a la baja proporción de OFC en la biomasa del reactor que se utilizó como inóculo, donde por RT-PCR se detectaron 0,01 % de OFC (Etchebere y Tiedje, 2004), mientras que en la bibliografía se ha reportado estos organismos constituyen entre un 10 al 30 % de los microorganismos del lodo, según el tipo de reactor, obteniéndose los valores más altos para reactores metanogénicos (Yamada y Sekiguchi, 2009). Pudo haber pasado que el enriquecimiento N1 haya tenido dificultades de crecimiento al igual que lo planteado en los enriquecimientos con extracto celular, por ejemplo en establecer un equilibrio en la comunidad microbiana (Sekiguchi *et al.*, 2001, Yamada y Sekiguchi, 2009).

Por otro lado, pudo haber problemas de metodología debido a los sesgos de las técnicas de toma de muestra, de extracción de ADN, de amplificación por PCR o de clonación, que no fueron eficientes para detectar los genes provenientes de OFC.

Se ha reportado además limitaciones en los métodos basados en PCR que pueden dar lugar a un sesgo en la proporción de secuencias de ARNr recobradas (Liesack *et al.*, 1997). Las dificultades de hacer bibliotecas genómicas a partir de muestras ambientales, ya han sido reportadas, donde a pesar de tener confirmada la presencia de ciertos organismos por alguna técnica, luego a la hora de aplicar métodos moleculares, estos organismos no son detectados mediante el clonado (Juretschko *et al.*, 2002).

En los reactores y enriquecimientos estos microorganismos se encuentran en acúmulos (Sato *et al.*, 2007, Sekiguchi *et al.*, 2001), por lo que la toma de muestra es muy heterogénea y dichos acúmulos pueden haber dificultado la lisis de las células.

Tomando en cuenta la baja proporción de microorganismos en el enriquecimiento, las dificultades en el muestreo y en la extracción de ADN más el sesgo de la técnica de PCR, esto puede llevar a una baja proporción de OFC en la biblioteca genómica, lo que se vería acentuado si es que existieran problemas en la metodología de la clonación.

El hecho de que solo se haya recuperado una secuencia del filo *Chloroflexi* en la placa N1, podría estar relacionado a que el medio acetato/nitrato era el que más se parecía al medio del reactor del que provenían estos organismos y estaban adaptados a estas condiciones. Por lo tanto, pudo haber ocurrido que estuvieran en mayor proporción en este enriquecimiento, aumentando las probabilidades de detectarlas en el clonado y la secuenciación.

### **Comunidad microbiana de los diferentes enriquecimientos**

Existe mucha información sobre la flora de los reactores anaerobios metanogénicos y SBR nitrificantes/desnitrificantes. No ocurre lo mismo con los reactores estrictamente

desnitrificantes. La mayoría de los estudios de la desnitrificación en los sistemas de tratamientos de efluentes, se ha llevado a cabo a escala de laboratorio. En estos sistemas independientemente del sustrato con que se hayan alimentado, la flora se ha mantenido estable durante la operación, con una predominancia de las *Proteobacteria* (Etchebehere *et al.*, 2001, Etchebehere *et al.*, 2002).

Este predominio también se puso de manifiesto en los enriquecimientos analizados, fundamentalmente en los clones de la placa N1. En el análisis filogenéticos de los clones se pudo observar el predominio de los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (fig. 11 y tabla 21a, anexo 2, fig. 19).

### **Placa N1, enriquecimiento acetato/nitrato**

Salvo para el filo *Tenericutes* los demás filos encontrados *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* (tabla 21a) correspondieron con lo reportado en la bibliografía para reactores desnitrificantes anaerobios (Etchebehere *et al.*, 2001, Etchebehere *et al.*, 2002, Satoh *et al.*, 2007). Predominaron los organismos desnitrificantes, lo que concordó con el medio desnitrificante utilizado. Las bacterias del género *Desulfomicrobium* en ausencia de  $\text{SO}_4^{2-}$  pueden crecer como organismos acetogénicos pero solo en sintrofia con organismos que consuman el  $\text{H}_2$  (Díaz-Báez, *et al.*, 2002).

El filo predominante fue *Proteobacteria* (53 %), fundamentalmente  $\beta$ -*Proteobacteria* (47 %), siendo *Thauera* el género mayoritario (37 %). Nuevamente en este trabajo se detectó la presencia del filo *Bacteroidetes* (21 %) en un alto porcentaje como lo reportado anteriormente para algunos reactores nitrificantes/desnitrificantes (Travers, 2007, Hoshino *et al.*, 2005). En menor porcentaje se detectaron *Firmicutes* y *Chloroflexi* en un 5 % cada una, lo que estaba por debajo de los valores de la bibliografía para los reactores UASB desnitrificantes (los inóculos para los enriquecimientos N1, D1 y T1 se tomaron de un reactor UASB desnitrificante) (Etchebehere *et al.*, 2001, Etchebehere *et al.*, 2002, Satoh *et al.*, 2007).

Un único clon presentó una secuencia con similitud con secuencias del género *Vulcanibacillus* dentro del filo *Firmicutes*, cuyo único representante descrito es *Vulcanibacillus modesticaldus*. Esta es una bacteria estrictamente anaerobia y reductora de nitrato, que crece quimio-organoheterotróficamente con carbohidratos, sustratos proteicos, y ácidos orgánicos con nitrato como aceptor de electrones. Esta bacteria solo utiliza nitrato como aceptor de electrones reduciéndolo exclusivamente a nitrito (L'Haridon *et al.*, 2006). Dentro de este género se ha reportado otro organismo (cepa

STGH) para el que se ha propuesto el nombre de *Tepidibacillus fermentans* que es una bacteria anaerobia moderadamente termófila y fermentadora que también utiliza nitrato como aceptor de electrones (Slobodkina *et al.*, 2013).

No se encontró bibliografía que mencionara la presencia de *Tenericutes* en los reactores desnitrificantes. Sí se encontró la asociación de estas bacterias comensales con *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* en otros sistemas acuáticos naturales, como en las comunidades bacterianas asociadas con *Lophelia pertusa*, en los corales de agua fría de México y Noruega (Kellogg *et al.*, 2009). Dentro del filo *Tenericutes*, las bacterias del género *Acheloplasma* al que se asignaron las secuencias de los clones encontrados en la placa, son aerobias o anaerobias facultativas e invariablemente utilizan glucosa como fuente de energía siendo aún no clara su función en las comunidades de suelos y aguas residuales (Brown *et al.*, 2007).

De acuerdo a las secuencias halladas en la placa N1 se podría suponer que la comunidad bacteriana está compuesta por un consorcio de bacterias fermentadoras hidrolíticas acidogénicas y desnitrificantes integrada por los filos  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* (Díaz-Báez *et al.*, 2002, Sekiguchi *et al.*, 1999). Se encontró también bacterias sulfato reductoras dentro de  $\delta$ -*Proteobacteria* (los géneros *Geoalkalibacter* y *Desulfomicrobium*). Donde las del género *Desulfomicrobium* en ausencia de  $\text{SO}_4^{2-}$  podrían utilizar el acetato en sintrofismo con bacterias consumidoras de  $\text{H}_2$  (Díaz-Báez *et al.*, 2002). Así como bacterias no fermentadoras desnitrificantes como las del género *Vulcanibacillus* que podrían utilizar acetato para su crecimiento en presencia de  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones (L'Haridon *et al.*, 2006). No se pudo concluir los posibles metabolitos usados por los miembros del género *Acheloplasma* ya que se ha reportado que solo utilizan glucosa como fuente de carbono (Brown *et al.*, 2007) y los enriquecimientos no se alimentaron con glucosa.

#### **Placa D1, enriquecimiento acetato/AQDS**

El 2,6-disulfonato-Antraquinona (AQDS) es un mediador redox análogo al ácido húmico, que actúa como transportador de electrones en la transferencia de electrones (Shyu *et al.*, 2002). En este enriquecimiento se utilizó acetato como fuente de energía y AQDS como aceptor de electrones. Debe de considerarse que de esta placa se tomaron 10 clones al azar, sin ninguna preselección previa y que de estos 10 clones solo se pudieron analizar 5 clones.

En los clones analizados (tabla 21b) se obtuvieron 3 secuencias afiliadas al filo *Firmicutes* que al igual que en la placa N1 se agrupaban con el género *Vulcanibacillus*.

Como ya se mencionó el único miembro del género aislado es *Vulcanibacillus modesticaldus*, una bacteria no fermentadora que únicamente utiliza  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones (L'Haridon *et al.*, 2006), sin embargo en ninguna de las publicaciones sobre el género revisadas se probó con AQDS como aceptor final de electrones. La utilización de este aceptor si se reportó en otra bacteria del filo para la que se propuso el nombre de *Tepidibacillus fermentans* que también utiliza nitrato como aceptor de electrones (Slobodkina G., *et al.*, 2013).

Los otros dos clones presentaron secuencias con homologías a secuencias del filo **Chlorobi** y agruparon en un 100 % en el género *Ignavibacterium*. La bacteria descrita de este género, *Ignavibacterium album* es una bacteria estrictamente anaerobia, quimioheterótrofa que no presenta crecimiento fototrófico. Moderadamente termofílica (45 °C), requiere de extracto de levadura para su crecimiento. Presenta crecimiento fermentativo con por ejemplo glucosa y piruvato pero no con acetato. No utiliza ninguno de los aceptores de electrones probados entre ellos  $\text{NO}_3^-$  (Iino *et al.*, 2010), y no se encontró en la bibliografía revisada la utilización de AQDS como aceptor de electrones por esta cepa.

#### **Placa T1, enriquecimiento acetato- $\text{H}_2$ /TCE**

En esta placa los clones a secuenciar se eligieron al azar. En 8 de los 13 clones analizados las secuencias presentaron alta similitud con secuencias del filo **Firmicutes** nuevamente dentro del género *Vulcanibacillus*. En los otros 5 clones analizados, las secuencias presentaron homología con secuencias del filo **Synergistetes** dentro de los géneros *Aminobacterium* y *Thermovirga* (tabla 21c).

Un grupo de investigadores reportaron dentro del filo **Firmicutes** en el género *Tepidibacillus* una bacteria capaz de crecer anaeróticamente de la reducción de nitrato, tiosulfato y AQDS (donde el nitrato se reduce a nitrito, tiosulfato y azufre se reducen a sulfuro), usando compuestos proteicos complejos, ácidos orgánicos e hidratos de carbono como donadores de electrones. También es capaz de fermentar piruvato, glucosa, fructosa y maltosa. Es moderadamente termofílica anaerobia y fue aislada de una instalación de almacenamiento subterráneo de gas, para la que propusieron la denominación de *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov. (Slobodkina G., *et al.*, 2013).

Ya había sido reportada la presencia de bacterias del filo **Firmicutes** en la biomasa granular de un reactor anaerobio a escala de laboratorio expuesto a TCE. En dicho trabajo se estudiaron los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en

respuesta a la temperatura (15 °C y 37 °C) y a la presencia o ausencia de TCE. En todos los enriquecimientos detectaron la presencia de organismos de los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Thermotogae*, y *Spirochaetes*, en diferentes proporciones. Sin embargo al comparar con los controles utilizados concluyeron que los cambios en las proporciones se relacionaban más con las variaciones de temperatura que con la presencia o ausencia de TCE (Siggins *et al.*, 2012).

A su vez Hug *et al.*, 2012 con métodos de análisis metagenómicos estudiaron el rol de la comunidad de bacterias no dechloradoras en tres enriquecimientos de *Dehalococcoides*. Concluyeron que las principales funciones metabólicas que permitían el crecimiento de la comunidad dechloradora eran llevadas a cabo fundamentalmente por diferentes géneros de bacterias no dechloradoras de los filos *Firmicutes*, *Euryarchaeota* y  $\delta$ -*Proteobacteria* en los tres enriquecimientos estudiados. En menor medida también reportaron la presencia de diferentes géneros de los filos *Bacteroidetes/Chlorobi*,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Synergistetes*. Sostuvieron que las redundancias funcionales en cada nicho contribuirían a la robustez del sistema, donde los procesos críticos estarían cubiertos por más de un grupo taxonómico. A la misma conclusión llegaron Brisson *et al.*, 2012 en cuanto a la robustez del sistema y redundancia de las funciones, utilizando también métodos de análisis metagenómicos. Al estudiar un consorcio de bacterias degradadoras de TCE hallaron bacterias de los filos *Clostridiaceae*, *Dehalococcoides*, *Desulfovibrio*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Spirochete*, *Synergistete*,  $\delta$ -*Proteobacterium* integrando dicha comunidad bacteriana.

Por lo tanto podríamos decir también que los clones secuenciados en la placa T1, no tenían por qué pertenecer a organismos que utilicen el TCE, sino que pueden pertenecer al grupo de bacterias no dechloradoras, que sostienen el crecimiento de las dechloradoras. En este punto cabe aclarar que el clonado fue realizado luego de un año de incubación y que solo se tiene el dato que al mes de incubación se había consumido parcialmente el TCE.

**Fig. 11.** Árbol filogenético construido con la herramienta TREE BUILDER del RDP con las secuencias de las placas N1, D1, y T1, junto con secuencias recuperadas con la herramienta SEQMATCH de la base de datos del RDP. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap para 100 repeticiones. La barra indica 10 sustituciones cada 100 nucleótidos.



Scale: 0.1

### 5.3 Análisis filogenéticos de secuencias del filo *Chloroflexi*

#### Árboles filogenéticos

Para estudiar cómo se agrupaba la secuencia N1 y otras secuencias de OFC obtenidas en estudios previos por la Dra. Etchebehere, se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias parciales y totales de los OFC de la base de datos del RDP y la herramienta TREE BUILDER del mismo. Debido a que los clones contenían insertos de secuencias parciales de los genes del ARNr 16S, algunos de los insertos contenían el principio del gen (10dhc, 11dhc, 99C, 3H, 10T y 5T, B12 Bader, AO6 Bader y GO6 Bader) y otros el final del mismo (N1, 58C, T14T3F, 20T, 10lix, 48G y 64G), por lo que fue necesario construir dos árboles filogenéticos (fig.12 y fig. 13).

Al ser analizadas las secuencias con la herramienta CLASSIFIER del RDP se tomó como valor de confianza aceptable para la clasificación un umbral igual de o superior a 95 %. Las secuencias de todos los clones afiliaron al filo *Chloroflexi*. Solamente se obtuvo un valor de umbral de confianza alto en la clasificación para la secuencia del clon AO6 Bader que fue la única que afilió a la familia *Caldilineaceae* dentro del género *Caldilinea*. El resto de las secuencias se agruparon dentro de la familia *Anaerolineaceae* pero con bajos valores de umbral de confianza para los diferentes géneros. El clon GO6 Bader no se consideró por tener un inserto demasiado pequeño (216 pb) (tablas 22 y 23).

#### Secuencias con el principio del gen

(10dhc, 11dhc, 99C, 3H, T10T7R, 5T, B12 Bader, AO6 Bader y GO6 Bader)

Las secuencias 10dhc, 11dhc, 3H, T10T7R y 5T se agruparon entre sí en un cluster con un bootstraps de 95 % (Fig. 12). Dentro de este cluster las secuencias 5T y T10T7R se agruparon entre sí con un bootstraps de 79 %. Salvo para la secuencia 3H, las secuencias provenían de bibliotecas de clones de reactores UASB desnitrificantes a escala de laboratorio, alimentados con acetato/nitrato y construidas con primer específicos para *Dehalococoides*. La diferencia para el clon 3H era que pertenecía a una biblioteca de clones construida con primer general para *Bacteria* a partir de una muestra de un reactor desnitrificante UASB alimentado con acetato/nitrato con agregado de tenso activo (tabla 8).

Las secuencias B12 Bader y 99C junto con estas 5 secuencias anteriores, se agruparon en un cluster mayor con un bootstrap de 100 %. El clon B12 Bader provenía de un reactor SBR de tratamiento de efluentes de una curtiembre y el clon 99C provenía de

una biblioteca de clones de los lodos de un reactor UASB desnitrificante a escala de laboratorio, alimentado con acetato/nitrato y construida con primer para *Dehalococoides*. Estas 7 secuencias a su vez se separaban de la clase *Anaerolineae* con un bootstrap bajo de 23 % (fig. 12).

Por su parte las secuencias AO6 Bader y GO6 Bader que provenían también del reactor SBR de una curtiembre, se agruparon entre ellas con un bootstrap 100 % y dentro de la clase *Caldilineae* con un 99 % (fig. 12).

Clon	pb	Filo	U. C. (%)	Familia	U.C. (%)	Género
10dhc	344	<i>Chloroflexi</i>	25	<i>Anaerolineaceae</i>	15	<i>Bellilinea</i>
11dhc	527	<i>Chloroflexi</i>	79	<i>Anaerolineaceae</i>	41	<i>Bellilinea</i>
99C	532	<i>Chloroflexi</i>	70	<i>Anaerolineaceae</i>	34	<i>Bellilinea</i>
3H,	761	<i>Chloroflexi</i>	74	<i>Anaerolineaceae</i>	46	<i>Longilinea</i>
T10T7R	682	<i>Chloroflexi</i>	64	<i>Anaerolineaceae</i>	36	<i>Bellilinea</i>
5T	726	<i>Chloroflexi</i>	79	<i>Anaerolineaceae</i>	52	<i>Longilinea</i>
B12 Bader	459	<i>Chloroflexi</i>	61	<i>Anaerolineaceae</i>	22	<i>Bellilinea</i>
AO6 Bader	702	<i>Chloroflexi</i>	100	<i>Caldilineaceae</i>	100	<i>Caldilinea</i>
GO6 Bader	216	---		---		---

**Tabla 22.** Esquema con los resultados obtenidos con la herramienta CLASSIFIER del RDP para las secuencias de los clones con el inserto del **principio del gen ARNr 16S**. Se detallan la cantidad de nucleótidos de las secuencias de cada clon. U.C. umbral de confianza.

### Secuencias con el final del gen

(N1, 58C, T14T3F, 20T, 10lix, 48G y 64G)

Todas las secuencias pertenecieron al filo *Chloroflexi*.

Las secuencias N1, 20T, T14T3F y 58C se agruparon en un cluster con un bootstrap de 97 %. Todas estas secuencias provenían de bibliotecas de clones de reactores UASB desnitrificantes a escala de laboratorio, alimentados con acetato/nitrato (tabla 8). Salvo para N1 que fue construida con un primer para el filo *Chloroflexi*, las demás librerías fueron construidas con primer para *Dehalococoides* (Fp –DHC1, Rp-DHC1377) (fig. 13).

La secuencia 10lix, provino de una biblioteca de clones construida con primer para *Chloroflexi* (GNSB941F-GNSB1340R), a partir de un lodo de un reactor UASB desnitrificante a escala de laboratorio, alimentado con aguas de un vertedero de lixiviados/nitrato. No se agrupó con ninguno de los otros clones (fig. 13).

Las secuencias de 48G y 64G agruparon juntas con bootstrap de 100 % y a su vez se agruparon con la clase *Anaerolineae* con un bootstrap de 98 %. Provenían de un mismo

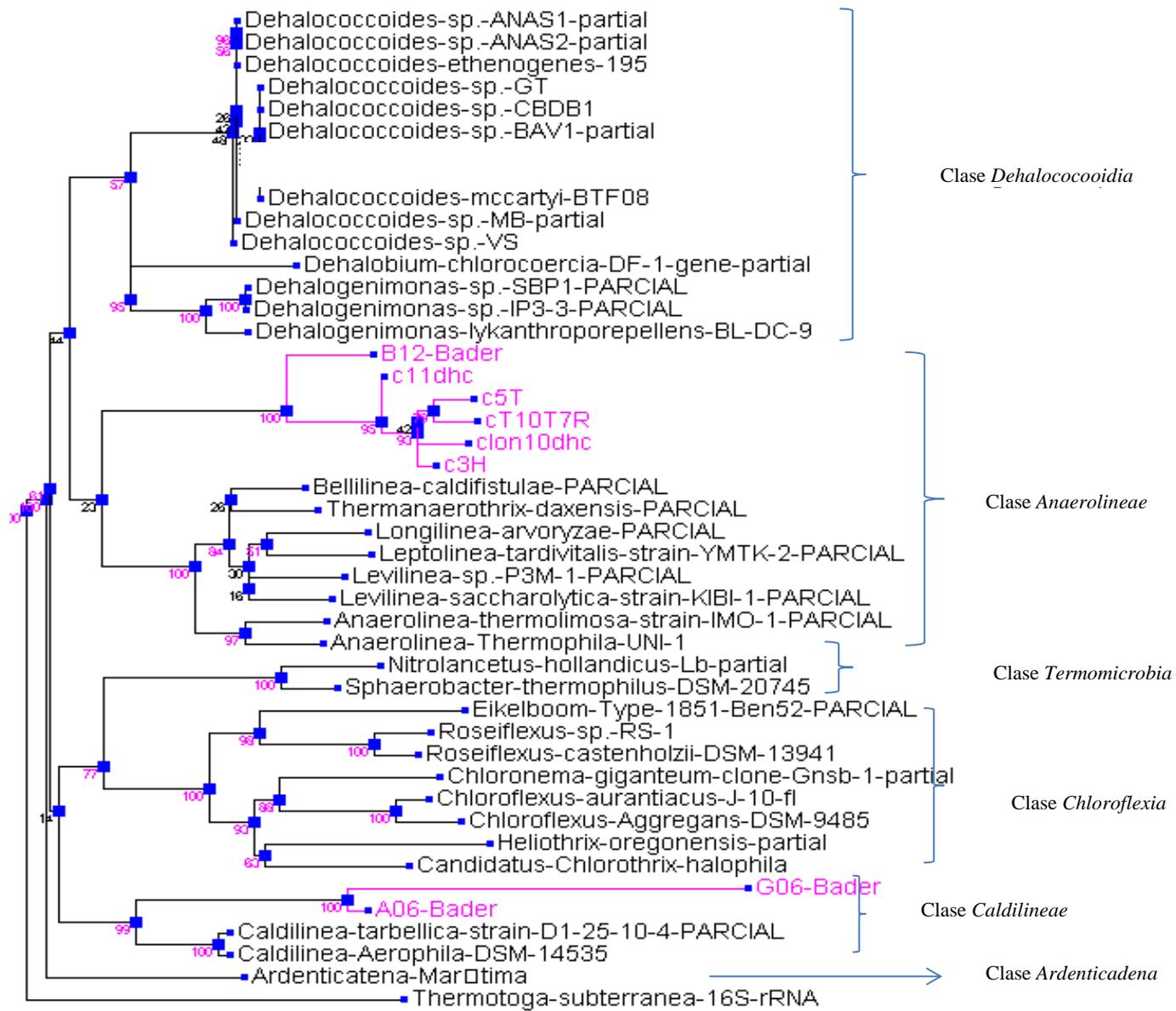
reactor UASB a escala de laboratorio alimentado con aguas de una planta tratamiento de una cervecera y nitrato. La biblioteca de clones se construyó usando primer para *Bacteria* (27F y 1492R) (fig. 13).

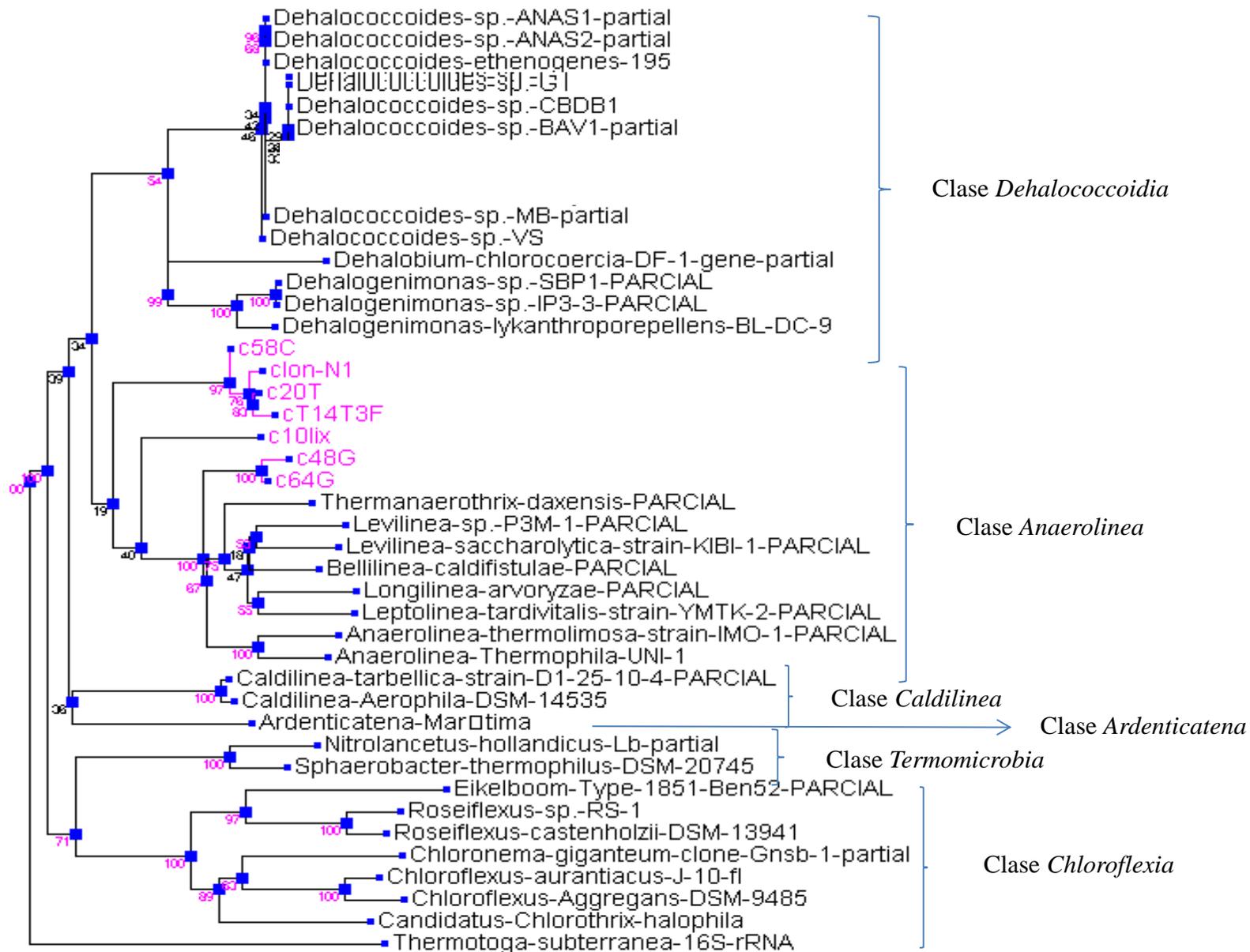
Clon	pb	Filo	U.C. (%)	Familia	U.C. (%)	Género
N1	748	<i>Chloroflexi</i>	71	<i>Anaerolineaceae</i>	44	<i>Bellilinea</i>
58C	632	<i>Chloroflexi</i>	67	<i>Anaerolineaceae</i>	41	<i>Bellilinea</i>
T14T3F	551	<i>Chloroflexi</i>	66	<i>Anaerolineaceae</i>	32	<i>Bellilinea</i>
20T	598	<i>Chloroflexi</i>	70	<i>Anaerolineaceae</i>	45	<i>Bellilinea</i>
10lix	595	<i>Chloroflexi</i>	90	<i>Anaerolineaceae</i>	33	<i>Leptolinea</i>
48G	533	<i>Chloroflexi</i>	100	<i>Anaerolineaceae</i>	49	<i>Bellilinea</i>
64G	628	<i>Chloroflexi</i>	100	<i>Anaerolineaceae</i>	56	<i>Bellilinea</i>

**Tabla 23.** Esquema con los resultados obtenidos con la herramienta CLASSIFIER del RDP para las secuencias de los clones con el inserto del **final del gen ARNr 16S**. Se detallan los % del umbral de confianza para familia y género, así como la cantidad de nucleótidos de cada secuencia. U.C. umbral de confianza.

**Fig 12.** Árbol filogenético de las secuencias de los clones con el inserto del principio del gen ARNr 16S. La secuencia de *Thermatoga subterranea* se usó como outgroup. Se utilizaron secuencias de la base de datos del RDP y las herramientas TREE BUILDER y CLASSIFIER del mismo.

**Fig 13.** Árbol filogenético de las secuencias de los clones con el inserto del final del gen ARNr 16S. La secuencia de *Thermatoga subterranea* se usó como outgroup. Se utilizaron secuencias de la base de datos del RDP y las herramientas TREE BUILDER y CLASSIFIER del mismo.





## 5.4 Análisis bioinformáticos

### Estudio de cobertura de diferentes sondas para el diseño de un método de T-RFLP específico para el filo *Chloroflexi*

Para poder diseñar un método de T-RFLP específico para los OFC es necesario conocer primero cuál o cuáles son los posibles primers que detectan mejor el filo. Luego se necesita conocer cuál o cuáles enzimas de restricción permiten obtener fragmentos terminales de longitudes diferentes al digerir los productos de PCR en estudio.

#### Secuencias de posibles primers

Se analizó secuencias diseñadas como sondas para *FISH* para los OFC (tabla 9). Se comparó estos posibles primers con secuencias de organismos aislados y también con secuencias de organismos no cultivados obtenidas de la base de datos RDP. Los resultados obtenidos se esquematizaron en las tablas 24a y 24b. En el anexo 3 se muestran los análisis para cada sonda.

Para la sonda **GNSB941** el 100 % de las secuencias de los organismos reconocidas pertenecen al Dominio *Bacteria*. El 94 % de estas secuencias pertenecen al filo *Chloroflexi* reconociendo el 68 % de las secuencias del filo (aisladas y no cultivadas) depositadas en la base de datos. Si se consideran solamente las secuencias de los organismos aislados, entonces el 96 % de las secuencias reconocidas pertenece al filo *Chloroflexi*, reconociendo el 75 % de las secuencias aisladas de los OFC (figs. 14a y 14b, en anexo 3 tablas 29a y 29b).

El 100 % de las secuencias de los organismos detectados por la sonda **CFX1223** pertenecen al Dominio *Bacteria*, siendo el 95 % de estas secuencias pertenecientes al filo *Chloroflexi*, detectando el 67 % de las secuencias del filo depositadas en la base de datos. Si se consideran solamente las secuencias de organismos aislados entonces el 99,4 % de las secuencias reconocidas pertenecientes al filo *Chloroflexi*, detectando el 68 % de las secuencias de los OFC aisladas (figs. 15a y 15b en anexo 3 tablas 30a y 30b).

Comparando las dos sondas que cubren el filo (**GNSB941** y **CFX1223**), la sonda GNSB941 es la que obtiene un mayor porcentaje de detección de secuencias de microorganismos, diferencia que se mantiene cuando se consideran solamente las secuencias de los organismos aislados (figs. 14a y 14b,).

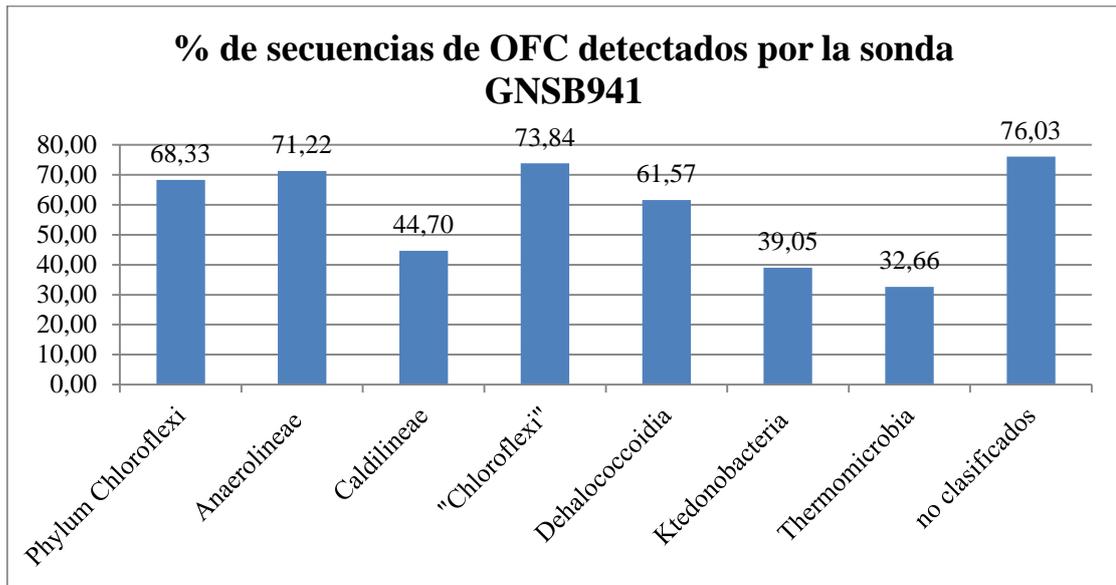
La sonda **CFX1A331** específica de la clase *Caldilineae*, presenta porcentajes levemente mayores (49 %) para dicha clase que las sondas del filo (45 %) y como era de esperarse

se gana en especificidad. Al considerar solamente las secuencias de los microorganismos aislados, detecta porcentajes levemente menores (80 %) que la sonda del filo GNSB941 (87 %), sin embargo estas diferencias de porcentajes se debe a una sola secuencia (figs. 20a y 20b de anexo 3).

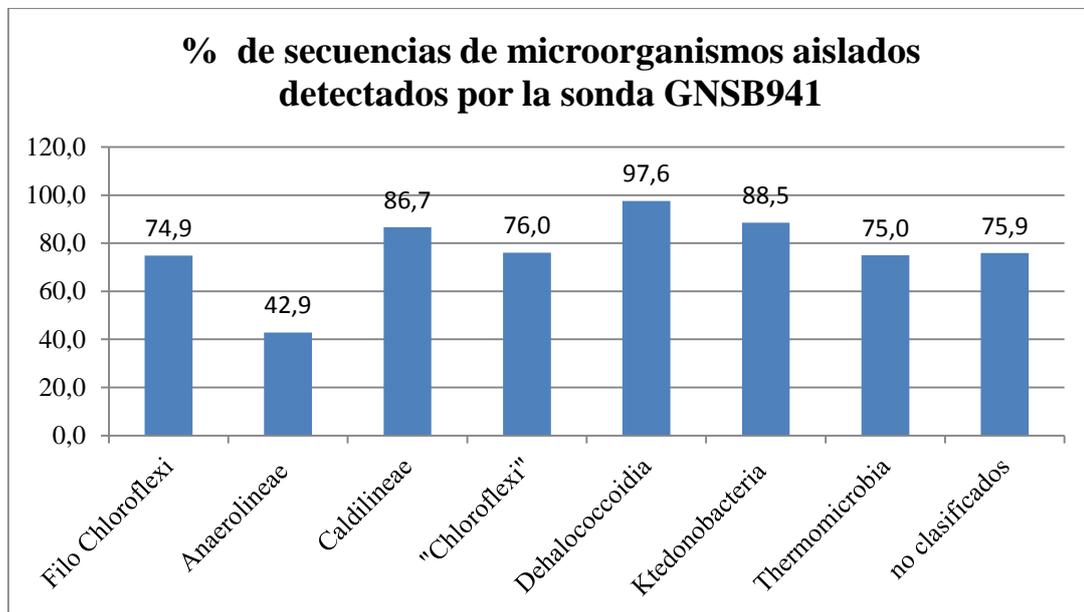
Dentro de las sondas definidas para la clase *Anaerolineae* (**CFX784**, **CFX197** y **GNSB633**) la que detecta mayor porcentaje de secuencias de microorganismos es CFX784. Si se consideran solamente las secuencias de los organismos aislados, CFX784 detecta una sola secuencia menos que la sonda general del filo GNSB941, pero aumentando enormemente la especificidad (fig. 21a y 21b de anexo 3). Por su parte, las sondas CFX197 y GNSB633 detectan muy pocos microorganismos de la clase *Anaerolineae* para la que fueron diseñadas (figs. 22, 23a y 23b de anexo 3).

Con la sonda **CFX109** se obtuvieron porcentajes de detección menores de las secuencias de microorganismos de la clase "*Chloroflexi*" que con la sonda general del filo GNSB941 (30 % contra 73,84 %). Cuando se consideran solamente los microorganismos aislados tiene un mejor rango de cobertura (80 % contra un 76 % de GNSB941) correspondiendo esas diferencias a 3 secuencias más detectados (figs. 24a y 24b de anexo 3).

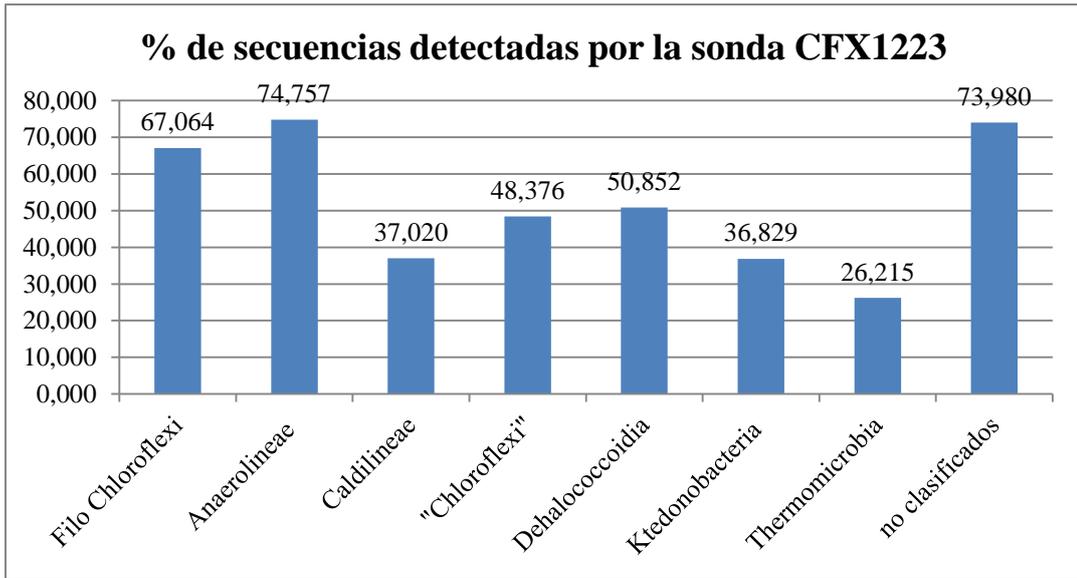
Con la sonda **Dhe1259t** definida para algunos *Dehalococcoides* spp, se gana en especificidad pero no cubre un rango muy alto de secuencias de microorganismos dentro de la clase "*Dehalococcoidetes*" (3,41 %). El porcentaje de detección aumenta cuando se considera solamente las secuencias de microorganismos aislados llegando al 29 % pero permaneciendo muy por debajo de los porcentajes detectados por las sondas generales del filo GNSB941 y CFX1223 (97 % y 100 % respectivamente (figs. 25a y 25b de anexo 3).



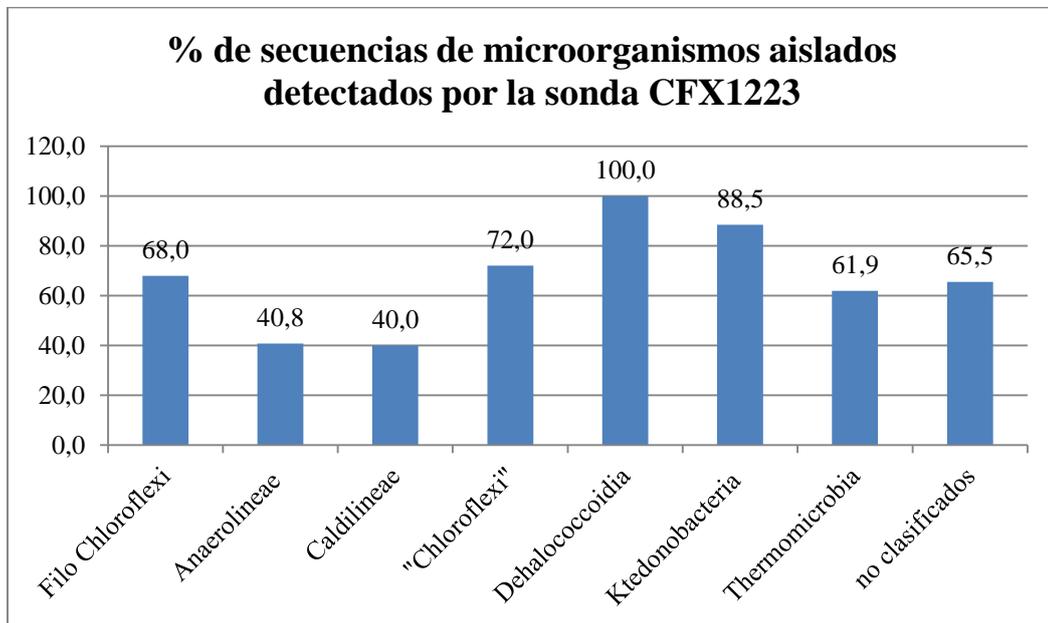
**Fig. 14a.** Porcentajes de secuencias de OFC detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* GNSB941. Se seleccionaron las secuencias de OFC tanto de aislamientos como de organismos no cultivados. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.



**Fig. 14b.** Porcentajes de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* GNSB941. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.



**Fig. 15a.** Porcentajes de secuencias de microorganismos detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* CFX1223. Se seleccionaron las secuencias de OFC tanto de aislamientos como de organismos no cultivados. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.



**Fig. 15b.** Porcentajes de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda CFX1223. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

01/06/2013

MICROORGANISMOS	CFX1223	GNSB941	CFX1A311	CFX784	CFX197	GNSB633	CFX109	Dhe1259t
Dominio <i>Bacteria</i>	1,03	1,01	0,02	0,15	0,00	0,00	0,03	0,003
Filo <i>Chloroflexi</i>	67,06	68,33	1,48	9,51	0,11	0,04	2,04	0,23
<i>Anaerolineae</i>	74,76	71,22	0,02	17,26	0,21	0,08	0,00	0,00
<i>Caldilineae</i>	37,02	44,70	48,54	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
<i>Chloroflexia</i>	48,38	73,84	0,00	0,00	0,00	0,00	30,07	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	50,85	61,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,41
<i>Ktedonobacteria</i>	36,83	39,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	26,21	32,66	0,00	0,11	0,00	0,00	1,36	0,00
no clasificados	73,98	76,03	0,15	1,25	0,00	0,00	1,19	0,00

**Tabla 24a.** % de secuencias de microorganismos aislados y no cultivados detectados por las diferentes sondas. Se marca en color la clase específica para la que fue diseñada cada sonda. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

01/06/2013

MICROORGANISMOS	CFX1223	GNSB941	CFX1A311	CFX784	CFX197	GNSB633	CFX109	Dhe1259t
Dominio <i>Bacteria</i>	0,100	0,054	0,003	0,005	0,000	0,001	0,018	0,003
Filo <i>Chloroflexi</i>	67,954	74,903	4,633	7,722	0,000	1,158	26,641	4,633
<i>Anaerolineae</i>	40,816	42,857	0,000	40,816	0,000	6,122	0,000	0,000
<i>Caldilineae</i>	40,000	86,667	80,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chloroflexia</i>	72,000	76,000	0,000	0,000	0,000	0,000	80,000	0,000
<i>Dehalococcoidia</i>	100,000	97,561	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	29,268
<i>Ktedonobacteria</i>	88,462	88,462	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Thermomicrobia</i>	61,905	75,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
no clasificados	65,517	75,862	0,000	0,000	0,000	0,000	31,034	0,000

**Tabla 24b.** % de secuencias de microorganismos aislados detectados por las diferentes sondas. Se marca en color la clase específica para la que fue diseñada cada sonda. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Discusión

La sonda que tiene una mayor cobertura del filo es GNSB941 (68%). Solo tiene un porcentaje menor que CFX1223 en 3,54 %, para la clase *Anaerolineae*. Esta diferencia se debe a 699 menos secuencias detectadas que CFX1223 (figs. 14a y 15a, en anexo 3 tablas 29a y 30a). Cuando se consideran solamente los organismos aislados, nuevamente GNSB941 tiene una mayor cobertura y solo está por debajo de la sonda CFX1223 para la clase *Dehalococcoidia*, pero en este caso esa diferencia se debe a una sola secuencia menos (figs. 14b y 15b, en anexo 3 tablas 29b y 30b). Björnsson *et al.*, 2002, propusieron utilizar ambas sondas juntas al aplicar la técnica de *FISH*, para aumentar la cantidad de microorganismos detectados. Esta medida fue aplicada en este trabajo en la detección de los OFC en los diferentes enriquecimientos estudiados.

Por lo tanto para la técnica de T-RFLP específica para los OFC los primers más adecuados sería el GNSB941, junto con uno general de *Bacteria*, como por ejemplo 27F. Por otro lado, la sonda que mejor cubre las secuencias de los microorganismos de la clase *Caldilineae* es CFX1A331 (48,54 % frente a 44,70 % de GNSB941 que corresponde con 34 secuencias más detectadas), ganándose además en especificidad. Si se consideran solamente las secuencias de los organismos aislados se pierde un 6,7 %, que corresponde a una sola secuencia menos (figs. 20a y 20b en anexo 3).

Las sondas específicas de las clases *Anaerolineae* CFX784, CFX197 y GNSB633 (figs. 21a, 21b, 22, 23a y 23b en anexo 3) y "*Dehalococcoidetes*" (Dhe1259t) (fig. 25a y 25b en anexo 3), presentan valores marcadamente inferiores a las sondas del filo para cada clase en particular. La sonda CFX197 no detecta ninguna de las secuencia de los organismos aislados. La sonda CFX109 de la clase *Chloroflexi* es la sonda específica que presenta los valores de porcentajes más altos que son 30 % y 80 % cuando se consideran las secuencias de los organismos aislados (figs. 24a y 24b en anexo 3), siendo este último valor mayor que los obtenidos con las sondas del filo GNSB941 y CFX1223.

## Estudio de enzimas de restricción

En esta sección se analizaron los fragmentos obtenidos al utilizar las enzimas de restricción *Msp* I *Taq* I y *Hha* I en las 14 secuencias completas de los genes del ARNr 16S de los OFC aislados (tomadas de la base de datos del RDP). Se analizó la posibilidad de utilizarlas para diferenciar los organismos del filo. Para completar el análisis también se tomaron en consideración las secuencias parciales de los genes del

ARNr 16S de los demás OFC aislados. Las secuencias y los sitios de corte de las enzimas de restricción se detallan en la tabla 10. Los resultados obtenidos con el tamaño de los fragmentos obtenidos con las tres enzimas, para las secuencias completas y parciales de los OFC, se detallan en las tablas 25a y 25b respectivamente.

La enzima **Taq I** cortó casi todas las secuencias completas obteniendo fragmentos entre 55 y 57 nt salvo para *Roseiflexus sp.* RS-1 de la clase *Chloroflexi* y *Sphaerobacter thermophilus* DSM 20745 de la clase *Thermomicrobia* que se obtuvo fragmentos de 615 y 78 nt respectivamente. En las secuencias parciales también predominó el fragmento de 55 nt salvo para las secuencias parciales de *A.thermolimosa* (141 nt), las dos secuencias de la clase *Dehalococcoidia* (133 nt), *Chloronema giganteum* (920 nt) y *Herpetosiphon sp.* (246 nt).

Por su parte la enzima **Hha I** cortó el 50 % de las secuencias completas y el 72 % de las secuencias parciales. Dentro de la clase *Anaerolineae*, cortó la secuencia completa de *A. thermophila* UNI-1 obteniéndose un fragmento de 1081 nt, y a la secuencia parcial *B. caldifistulae* (1415 nt) pero no cortó a la mayoría de las secuencias parciales ni a *A. thermolimosa* IMO-1. Sin embargo aquí se debe considerar que el corte de las secuencias completa está casi al final de las mismas.

Dentro de la clase *Caldilineae*, no cortó la secuencia de *C. aerophila* que es la única secuencia completa, pero sí cortó a la secuencia parcial de *C. tarbellica* obteniéndose un fragmento de 701 nt.

Dentro de la clase *Chloroflexi* cortó tanto las secuencias completas como las secuencias parciales mayoritariamente con un fragmento de 556 nt salvo para las dos secuencias completas del género *Roseiflexus* (189 nt).

Dentro de la clase *Dehalococcoidia* no cortó ninguna de las 9 secuencias provenientes de organismos del género *Dehalococcoides* analizadas (5 completas y 4 parciales) y si cortó las 3 secuencias del género *Dehalogenimonas* (1 completa y 2 parciales) obteniéndose fragmentos de 39 nt.

Dentro de la clase *Thermomicrobia* solo cortó 2 de las 3 secuencias parciales analizadas del género *Thermomicrobium* pero con diferentes fragmentos (835 y 80 nt).

En la clase *Ktedonobacteria* cortó todas las secuencias parciales analizadas con diferentes tamaños de fragmentos para las secuencias del género *Thermogemmatispora* (236 nt, 189 nt y 146 nt), y las secuencias parciales de los géneros *Ktedonobacter* y *Thermosporothrix* (607 nt y 688 nt respectivamente) También cortó a la única secuencia parcial de la clase *Ardenticatenia* en un fragmento de 37 nt.

Todas las secuencias completas y parciales tenían el sitio de corte de la enzima *Msp I*. No se obtuvo un comportamiento uniforme con esta enzima para todos los OFC. Las secuencias completas de la clase *Dehalococcoidia* presentaron un fragmento N-terminal de entre 509 y 513 nt. La clase *Chloroflexi* mayoritariamente presentó fragmentos de 118 nt en las secuencias completas y 433 nt en las secuencias parciales. La clase *Ktedonobacteria* presentó fragmentos de mayoritariamente 133 a 138 nt salvo para *K. racemifer* que presentó uno de 677 nt. Dentro de la clase *Thermomicrobia* el género *Thermomicrobium* presentó un fragmento de 121 nt mientras que *N. hollandicus* presentó uno de 467 nt. Sin embargo esta enzima produce fragmentos diferenciales en las secuencias completas de las especies de las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae* que son las que mayoritariamente se recuperan en los sistemas de tratamiento de efluentes.

MICROORGANISMO	Pares de bases*	Clase	Posición del primer	Tamaño del fragmento N-terminal		
				<i>Msp</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hha</i> I
<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1	1498	<i>Anaerolineae</i>	3	519	54	1081
<i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535	1500	<i>Caldilineae</i>	3	205	54	s/c
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	1435	<i>Dehalococcoidia</i>	s/u	513**	55**	s/c
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BTF08	1497	<i>Dehalococcoidia</i>	8	513	55	s/c
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	1435	<i>Dehalococcoidia</i>	s/u	513**	55**	s/c
<i>Dehalococcoides</i> sp. GT	1485	<i>Dehalococcoidia</i>	1	513	55	s/c
<i>Dehalococcoides</i> sp. VS	1490	<i>Dehalococcoidia</i>	1	513	55	s/c
<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	1492	<i>Dehalococcoidia</i>	1	513	55	38
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	1474	<i>Chloroflexia</i>	1	75	55	557
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	1479	<i>Chloroflexia</i>	1	118	55	556
<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	1469	<i>Chloroflexia</i>	1	118	55	189
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	1471	<i>Chloroflexia</i>	1	118	614	188
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	1497	<i>Thermomicrobia</i>	1	120	77	s/c
<i>Candidatus Chlorothrix halophila</i>	1455	no clasificada	4	421	54	568

**Tabla 25a.** Tamaño en pares de bases del fragmento terminal obtenido por el tratamiento *in silico* de las **secuencias completas** de los OFC (donde las diferentes clases se diferencian por colores) con las enzimas de restricción *Msp* I, *Taq* I y *Hha* I. Se indica a su vez la posición del sitio de reconocimiento del primer 27F. s/u: sin secuencia de unión al primer 27F en la secuencia analizada. s/c: sin la secuencia de corte de la enzima. Tamaño del fragmento N-terminal: tamaño del fragmento obtenido por el tratamiento de la enzima indicada en cada cuadro. \* Pares de bases de la secuencia analizada. \*\* Tamaño del fragmento N-terminal calculado en base a la alineación de secuencias. La información de las secuencias fue obtenida de las bases de datos NCBI y RDP. El análisis informático se realizó con el programa Mega 5.2.

MICROORGANISMO	Pares de bases*	Clase	Posición del primer	Tamaño del fragmento N-terminal		
				<i>Msp</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hha</i> I
<i>Anaerolinea-thermolimosa</i> IMO-1	1457	<i>Anaerolineae</i>	s/u	199**	141**	s/c
<i>Bellilinea-caldifistulae</i> GOMI 1	1425	<i>Anaerolineae</i>	s/u	173**	55**	1415**
<i>Leptolinea-tardivitalis</i> YMTK-2	1426	<i>Anaerolineae</i>	s/u	520**	55**	s/c
<i>Levilinea-saccharolytica</i> KIBI-1	1424	<i>Anaerolineae</i>	s/u	516**	55**	s/c
<i>Levilinea</i> P3M-1	1462	<i>Anaerolineae</i>	s/u	524**	55**	s/c
<i>Longilinea-arvoryzae</i> KOME-1	1422	<i>Anaerolineae</i>	s/u	170**	55**	s/c
<i>Thermanaerotherix-daxensis</i> GNS-1	1459	<i>Anaerolineae</i>	s/u	523**	58**	42
<i>Caldilinea-tarbellica</i> D1-25-10-4	1400	<i>Caldilineae</i>	s/u	205**	55**	701**
<i>Dehalococcoides</i> ANAS1	1354	<i>Dehalococcoidia</i>	1	513	40	s/c
<i>Dehalococcoides</i> ANAS2	1354	<i>Dehalococcoidia</i>	1	513	55	s/c
<i>Dehalococcoides</i> - BAV1	1420	<i>Dehalococcoidia</i>	s/u	513**	55**	s/c
<i>Dehalococcoides</i> MB-partial	1489	<i>Dehalococcoidia</i>	1	512	55	s/c
<i>Dehalogenimonas</i> IP3-3	1433	<i>Dehalococcoidia</i>	s/u	509**	133**	39**
<i>Dehalogenimonas</i> - SBP1	1433	<i>Dehalococcoidia</i>	s/u	509**	133**	39**
<i>Chloronema-giganteum</i> Gnsb-1	1460	<i>Chloroflexia</i>	s/u	117**	920**	568**
<i>Oscillochloris</i> sp. R	1408	<i>Chloroflexia</i>	s/u	433**	55**	556**
<i>Oscillochloris trichoides</i> DG-6	1418	<i>Chloroflexia</i>	s/u	433**	55**	556**
<i>Oscillochloris</i> sp. BM	1413	<i>Chloroflexia</i>	s/u	433**	55**	556**
<i>Oscillochloris</i> sp. A19	1389	<i>Chloroflexia</i>	s/u	433**	55**	556**
<i>Herpetosiphon geysericola</i>	1417	<i>Chloroflexia</i>	s/u	68**	55**	555**
<i>Herpetosiphon</i> sp.	1303	<i>Chloroflexia</i>	s/u	448**	246**	557**
<i>Herpetosiphon</i> sp. OSI-B2	1280	<i>Chloroflexia</i>	s/u	447**	55**	556**
<i>Heliothrix-oregonensis</i> IS/F-1	873	<i>Chloroflexia</i>	s/u	379**	907**	63**

**Tabla 25b.** Continúa en la página siguiente.

MICROORGANISMO	Pares de bases*	Clase	Posición del primer	Tamaño del fragmento N-terminal		
				<i>Msp I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Hha I</i>
<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM-44963	970	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	677**	332**	607**
<i>Thermosporothrix hazakensis</i> SK20-1	1415	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	137**	60**	688**
<i>Thermogemmatispora foliorum</i> ONI-5	1444	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	134**	55**	236**
<i>Thermogemmatispora onikobensis</i> ONI-1	1444	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	134**	55**	236**
<i>Thermogemmatispora</i> sp. BPP55	1368	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	138**	625**	189**
<i>Thermogemmatispora</i> sp. PM5	1296	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	138**	821**	189**
<i>Thermogemmatispora</i> sp. PM6	1303	<i>Ktedonobacteria</i>	s/u	133**	818**	146**
<i>Ardenticatena martima</i> 110S	1453	<i>Ardenticatena</i>	s/u	132**	55**	37**
<i>Nitrolancetus hollandicus</i> -Lb	1470	<i>Thermomicrobia</i>	1	467	926	s/c
<i>Thermomicrobium roseum</i> strain P-2	1371	<i>Thermomicrobia</i>	s/u	121	448**	835**
<i>Thermomicrobium</i> sp. KI3	1275	<i>Thermomicrobia</i>	s/u	122**	941**	80**
<i>Kouleothrix aurantiaca</i>	1396	no clasificada	s/u	496**	593**	135**

**Tabla 25b.** Tamaño de los fragmentos obtenidos por el tratamiento *in silico* de las **secuencias parciales** de los OFC detallados (donde las diferentes clases se diferencian por colores) utilizando las enzimas de restricción *Msp I*, *Taq I* y *Hha I*. Se indica a su vez la posición del sitio de reconocimiento del primer 27F. s/u; sin sitio unión al primer 27F en la secuencia analizada. s/c; sin sitio de corte de la enzima. \* Pares de bases de la secuencia analizada. Tamaño del fragmento N-terminal: tamaño del fragmento N-terminal obtenido por el tratamiento de la enzima indicada en cada cuadro. \*\* Tamaño del fragmento N-terminal calculado en base a la alineación. La información de las secuencias fue obtenida de las bases de datos NCBI y RDP. El análisis informático se realizó con el programa Mega 5.2.

## **Discusión**

### **Enzima *Taq I***

Esta enzima no permitió diferenciar entre los organismos de las diferentes clases del filo *Chloroflexi*, con ella se obtuvo el mismo sitio de corte para casi todas las secuencias completas aisladas. Se obtendría un pequeño fragmento de 55 nt para la mayoría de las secuencias. La excepción la darían las secuencias de de *Sphaerobacter thermophilus* dentro de la clase *Thermomicrobia* que generaría un fragmento un poco mayor de 77 pb y la secuencia de *Roseiflexus sp.* RS-1 dentro de la clase *Chloroflexi* con un fragmento de 614 pb. Teniendo en cuenta esto, no sería adecuado utilizarla en la técnica de T-RFLP para diferenciar entre los organismos.

### **Enzima *Hha I***

Dentro de las secuencias completas, esta enzima no logró un corte común a la mayoría los OFC, ni tampoco logró diferenciar entre las diferentes clases. Sin embargo se obtuvieron cortes particulares entre las distintas secuencias.

Dentro de la clase *Chloroflexi*, las secuencias del género *Chloroflexus* (*C. aggregans* y *C. aurantiacus*) presentaron un fragmento de 556 nt, mientras que los dos del género *Roseiflexus* (*R. castenholzii* y *Roseiflexus sp.*) presentaron uno de 188 nt. Tampoco presentó un comportamiento uniforme dentro de la clase *Caldilineae* donde corta la secuencia *C. tarbellica* D1-25-10-4 con un fragmento de 701 nt y no corta la secuencias de *C. aerophila* DSM 14535. Dentro de las secuencias analizados de la clase *Dehalococcoidia*, ninguna de las secuencias completas o parciales del género *Dehalococcoides* presentaban sitios de corte y si presentaban sitios de cortes las secuencias del género *Dehalogenimonas* con un fragmento de 39 nt.

El tratamiento con esta enzima no logró separar dentro de las clases *Thermomicrobia* donde no cortó la secuencia completa de *S. thermophilus* y si cortó 2 de las tres secuencias parciales pero con distintos fragmentos N-terminales estimados.

Todas las secuencias parciales de la clase *Ktedonobacteria* y la única secuencia parcial de la clase *Ardenticatenia* presentaron cortes.

### **Enzima *Msp I***

Con esta enzima se logró un corte diferenciado para las secuencias completas de los organismos del filo. Para la clase *Dehalococcoidia* se obtuvo el mismo fragmento para los dos géneros, *Dehalococcoides* y *Dehalogenimonas* (513 nt) . Sin embargo, se generó un fragmento casi del mismo tamaño (519 nt) en la secuencia de *Anaerolinea thermophila* UNI-1. Mientras que clase *Chloroflexi* generó un fragmento de 118 nt.

Sin embargo, con esta enzima se obtiene un corte diferenciado entre las dos secuencias completas de los organismos de las clases *Anaerolinea* y *Caldilinea* del subfilo I que son los OFC que mayoritariamente se recuperan en los sistemas de tratamientos anaerobios desnitrificantes. Para la bacteria *A. thermophila* se obtiene un fragmento de 519 nt, mientras que para *C. aerophila* es de 205 nt. Esta enzima podría utilizarse para obtener fragmentos terminales de longitudes diferentes en secuencias de las clases *Anaerolinea* y *Caldilinea* (que son las mayoritariamente recuperadas de los sistemas de tratamientos anaerobios desnitrificantes), para diferenciar estas bacterias en ensayos de T-RFLP.

## 6. Conclusiones y perspectivas.

### Respuestas a las preguntas planteadas

\*¿Los OFC pueden utilizar compuestos provenientes de restos celulares en condiciones desnitrificantes o anaerobias?

Los resultados de este trabajo muestran que las bacterias del filo *Chloroflexi* pudieron mantenerse en las condiciones anaerobias estudiadas, con extracto celular y NAG, en presencia o ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . Ya que con el correr del tiempo (16 meses) las bacterias se mantenían en el cultivo y se podían detectar por *FISH* aunque no se pudieron cuantificar, ni confirmar que aumentaran su proporción.

\*¿Es posible enriquecer estos organismos utilizando compuestos similares a restos celulares?

En base a los datos obtenidos en los diferentes enriquecimientos realizados no podemos concluir que efectivamente se enriqueció en estos organismos en las condiciones planteadas. Sin embargo se apreció un lento aumento de los mismos con el correr del tiempo. En las condiciones planteadas (teniendo en cuenta además que no se partió de un cultivo enriquecido en OFC como recomienda la bibliografía), las demás bacterias de rápido crecimiento del consorcio bacteriano que compiten con los OFC, pueden haber llegado a impedir obtener un cultivo enriquecido en los filamentos de *Chloroflexi* que permita su posterior aislamiento.

Para verificar la tendencia observada del aumento del número de filamentos en los enriquecimientos, se podría estudiar la variación en la cantidad de microorganismos del filo a través de las muestras de ADN extraídas (que se extrajeron conjuntamente con la muestras para *FISH*) en los diferentes tiempos de incubación, utilizando por ejemplo las técnicas de Real Time-PCR. A su vez se podría comparar esos datos con los del *FISH* para ver si se confirma una correspondencia entre ellos. Estas muestras de ADN no fueron analizadas en el momento de la pasantía por carecer tanto del tiempo como de la posibilidad de realizar el método en ese momento.

\*¿Los OFC detectados por secuenciación pertenecen a un determinado género/especie o a varios?

La mayoría de los OFC detectados en trabajos previos pertenecieron a la clase *Anaerolineae* y en menor medida a la clase *Caldilineae*. Esto concuerda con la bibliografía que indica que la mayoría de las secuencias recuperadas de los sistemas de tratamientos de efluentes corresponden a estas clases y fundamentalmente a la clase *Anaerolineae* (Yamada y Sekiguchi, 2009).

\*¿Cómo se podría diseñar un método para estudiar la diversidad de este grupo en muestras de reactores?

Para amplificar las secuencias de los OFC por PCR los primers más adecuados serían el GNSB941 que el que mejor cubre al filo, junto con uno general para bacterias como el 27F.

Se podría continuar aplicando la técnica de *FISH* utilizando un método de recuento automático. Para estudiar la presencia de OFC las sondas que mejor cubren el filo son GNSB941 y CFX1223. Se utilizan juntas para aumentar el rango de detección. Para estudiar la presencia de organismos de las clases *Caldilineae*, *Anaerolineae*, y *Chloroflexi* específicamente se pueden utilizar respectivamente las sondas CFX1A311, CFX784, y CFX109 que son específicas de cada clase. Algunos microorganismos de la clase *Dehalococcoides* pueden ser detectados por la sonda Dhc1259t. Sin embargo, los rangos de detección de las diferentes sondas específicas son bastante más bajos que los valores obtenidos para las sondas generales del filo (GNSB941 y CFX1223). Además no se han encontrado sondas para las demás clases, *Thermomicrobia*, *Ktedonobacter* ni *Ardenticatena*. Sí se diseñaron para la especie *Nitrolancetus hollandicus* (perteneciente a *Ktedonobacter*) las sondas Ntlc439 y Ntlc804.

Con esta técnica además se puede determinar la ubicación de los filamentos en los gránulos o flóculos de los reactores.

Se podría tener además una estimación de los OFC en relación con las bacterias totales, utilizando por un lado las sondas del filo (GNSB941 y CFX1223) y otro sondas universales para bacterias, aunque ya se ha comprobado lo dificultoso de aplicar esta técnica para el recuento de los filamentos.

Para el estudio de la variación de comunidades en muestras de tratamiento anaerobios desnitrificantes, donde se ha visto que de los OFC los que predominan son los organismos del subfilo 1 (Yamada y Sekiguchi, 2009), se podría aplicar la técnica de T-RFLP específico utilizando un primer con la secuencia de la sonda GNSB941 que mejor cubre el filo y la enzima *Msp* I con la que se obtienen cortes diferenciados para las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae*.

Otro método para estudiar la diversidad microbiana es aplicando la técnica de secuenciación masiva. En dicha técnica se analizan un gran número de secuencias del reactor, aumentando entonces las secuencias de los OFC recuperadas para ser analizadas junto con el resto de la comunidad bacteriana. Con este método se obtiene un gran número de secuencias pero no se tiene información de cómo se organiza la comunidad, sin embargo si lo que interesa es saber que microorganismos están presentes, este sería el método de preferencia.

## 6.1 Enriquecimientos

### Extracto Celular como sustrato

Para llegar a enriquecer en los OFC, sería aconsejable partir de inóculos enriquecidos en estos organismos y eliminar las bacterias de rápido crecimiento. Dado que los OFC son bacterias de muy lento crecimiento, estarían en desventaja para competir por el sustrato con las de rápido crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que miembros filamentosos de la clase *Bacteroidetes* utilizan el mismo tipo de sustrato (Kindaichi *et al.*, 2004), y la competencia entre estas especies es por lo tanto probable (Yamada y Sekiguchi, 2009, Kragelund *et al.*, 2007, Sekiguchi *et al.*, 2001).

En los pocos trabajos que lograron aislar microorganismos del filo, partieron de muestras enriquecidas. Por ejemplo, Sekiguchi *et al.*, 2001 utilizaron las proyecciones de los gránulos de un reactor UASB termófilo metanogénico, donde estos organismos eran altamente abundantes. Por otro lado, Imachi *et al.*, 2000 utilizaron un enriquecimiento previo con un sustrato difícilmente degradable para eliminar las bacterias de rápido crecimiento. Luego de comprobar la existencia de organismos del filo *Chloroflexi* y diluir el enriquecimiento siguieron con un medio en glucosa y extracto de levadura para eliminar las bacterias que específicamente degradaban el sustrato inicial y favorecer el crecimiento de *Chloroflexi*.

Otra posibilidad de enriquecimiento podría ser probar el co-cultivo con bacterias metanogénicas. Con ello se evitaría el estancamiento de los OFC (fundamentalmente ciertos organismos de la clase *Anaerolineae*) provocado por la acumulación del H<sub>2</sub> generado durante los procesos fermentativos. Sekiguchi *et al.*, 2001 reportaron que este tipo de co-cultivo favorecía el crecimiento de los OFC.

Se podría probar además cultivar en condiciones termófilas y con Fe(III), debido al reciente descubrimiento de la bacteria termofílica *Ardenticatena marítima* que es capaz de crecer con la reducción desasimilativa de Fe(III) (Kawaichi *et al.*, 2013).

## **NAG como sustrato**

Uno de los principales problemas de este enriquecimiento fue la cuantificación del NAG y su posible alteración por contaminación o por su precipitación. Luego de varios intentos se demostró que utilizando soluciones de NAG filtradas dos veces o esterilizadas por autoclave era posible eliminar los problemas de contaminación.

Para poder utilizar este sustrato habría que seguir estudiando la posibilidad de utilizar las soluciones de NAG doblemente filtradas y comprobar si se mantienen sin contaminar con el transcurso de los días. A su vez, monitorear si no se forman cristales en las soluciones de 20 µg/mL y si es así, investigar si existe alguna técnica para medir concentraciones menores a 20 µg/mL.

Por otro lado se debería continuar con los estudios de la solución que se esterilizó por autoclave, preparando nuevos blancos con y sin  $\text{NO}_3^-$  para confirmar si con este procedimiento se puede evitar la contaminación y la precipitación de las diferentes concentraciones de NAG y poder seguir su consumo por espectrofotometría con la técnica del DNS.

Debido a las dificultades en la cuantificación del NAG no fue posible determinar si los OFC se enriquecen con este sustrato. Para comprobar esto se podría analizar las muestras de ADN extraídas de los enriquecimientos con este sustrato y/o extraer nuevas muestras de ADN con mayores tiempos de incubación y aplicar técnicas como Real Time-PCR para determinar la cantidad de microorganismos *Chloroflexi* y su evolución en el tiempo.

En este punto cabe preguntarse ¿qué proporción de los *Chloroflexi* crecieron en base al NAG consumido y cual lo hizo a expensas de las bacterias que murieron? En este punto para el estudio de la utilización de este sustrato en particular por los OFC se puede aplicar la técnica de MAR-FISH donde se introduce al medio un sustrato marcado radioactivamente y luego se observa si ingresa a la célula por autoradiografía.

## ***FISH***

Con respecto a la técnica de hibridación específica *in situ* fluorescente el principal problema para la detección de los OFC fue las dificultades para la cuantificación por esta técnica, para lo cual se podrían tomar algunas medidas:

- Se obtuvo una mayor detección de filamentos por *FISH* cuando se hizo la extracción de la muestra de lodo con agujas de mayor calibre. Por lo que a futuro es recomendable hacer las extracciones con las agujas de calibre 18G11/2 o mayor.

- Con el objetivo de homogeneizar las muestras para facilitar la reproducibilidad de las tomas, y poder observar mejor los filamentos “dentro” de los acúmulos, se podría probar someter las muestras al tratamiento con ultrasonido, previo a la técnica de *FISH*.  
-Para que el método de recuento de filamentos no sea tan engorroso y en el que quizás se pueda obtener una estimación del error de la medida, se podría utilizar un método de recuento automatizado. Por ejemplo uno que calcule el área de las células del filo (que hibridan con la sonda específica) frente al área de las células totales (que se tiñan con DAPI).

### **Medición de sustratos utilizados**

#### **(NAG y Extracto celular)**

No fue posible detectar el consumo tanto de NAG como de extracto celular por los organismos de los enriquecimientos. Se podría probar otras estrategias para determinar la utilización de estos sustratos. Por ejemplo la técnica denominada MAR-FISH que detecta las preferencias de consumo del sustrato marcado radiactivamente, por parte de los organismos que forman parte de una comunidad.

Este método se basa en la incorporación del sustrato marcado radioactivamente dentro de la célula, y la detección de las células activas utilizando autoradiografía. La identificación de las células se hace por medio de hibridación fluorescente *in situ* (*FISH*). La detección e identificación de células activas se lleva a cabo utilizando microscopía. Esta técnica permite también la cuantificación de células activas sin que exista ningún sesgo procedente de la extracción de ADN o PCR. Sin embargo se requieren condiciones especiales para trabajar con productos radiactivos (Kragelund *et al.*, 2007, Imachi *et al.*, 2000, y Lee *et al.*, 1999).

Utilizando esta técnica se utilizó soluciones de NAG menos concentradas (88  $\mu$ M) y un tiempo de incubación de 4 h, con lo que podrían evitarse los problemas de precipitación del NAG (Kindaichi *et al.*, 2004).

## **6.2 Análisis de secuencias de biblioteca de clones obtenidas de enriquecimientos previos**

Debido a que casi siempre los OFC se han encontrado en bajo número en las diferentes comunidades (Yamada y Sekiguchi, 2009) no es aconsejable hacer una selección de clones al azar al analizar las secuencias de los genes ARNr de 16S en las bibliotecas de clones, debido a la baja probabilidad de detectar a los OFC (ya que se encuentran en baja proporción).

Se puede hacer una pre-selección, haciendo un tratamiento con enzimas de restricción en los amplificadores y analizando los diferentes perfiles obtenidos (ARDRA). Es de considerar, que los clones buscados probablemente estén en los perfiles menos repetidos.

### **6.3 Análisis de las secuencias obtenidas previamente**

Del análisis de las secuencias de OFC obtenidas en trabajos anteriores y recuperadas de reactores de tratamiento de efluentes, se observó que al igual que lo reportado por la bibliografía (Yamada y Sekiguchi, 2009), la mayoría ellas se agruparon dentro de las secuencias de la clase *Anaerolineae*, recuperándose también dos secuencias perteneciente a la clase *Caldilineae*.

De las 18 secuencias en total analizadas, 15 de ellas provenían de diferentes reactores desnitrificantes y 3 de reactores SBR de tratamientos de efluentes. Las 15 secuencias analizadas de los reactores desnitrificante se agruparon dentro de las secuencia de la clase *Anaerolineae*, mientras que de las tres secuencias del SBR, una agrupó con las secuencias de *Anaerolineae* y las otras 2 dentro de las secuencias de la clase *Caldilineae*. Para confirmar esta tendencia se podría continuar el análisis de los diferentes sistemas de tratamiento de efluentes, aplicando por ejemplo la secuenciación masiva para aumentar en número de secuencias recuperadas.

### **6.4 Métodos para analizar la abundancia y diversidad de OFC en muestras ambientales**

#### ***FISH***

Para el monitoreo de los organismos del filo en enriquecimientos mediante *FISH* es aconsejable la sonda GNSB941 porque es la que detecta un mayor porcentaje de organismos aún de los no cultivados. La utilización de la sonda GNSB941 junto con CFX1223, aumenta el rango de detección. En el caso de buscar organismos de la clase *Caldilineae* es preferible el uso de la sonda CFX1A331 porque detecta casi la misma cantidad de organismos que con GNSB941 pero se gana notoriamente en especificidad. Según sea el interés en cada clase o microorganismo en particular, con las diferentes sondas específicas se gana en especificidad pero se pierde en cantidad de organismos detectados. Hay que considerar que de por sí estos organismos están usualmente en baja proporción, por lo que en la búsqueda de la especificidad se puede terminar sin detectar los microorganismos buscados.

## **T-RFLP**

Para diseñar un método de T-RFLP específico, se podría utilizar como primer la secuencia de la sonda GNSB941 que es la que cubre más organismos del filo, junto con primer general de *Bacteria* 27F.

En muestras de sistemas de tratamientos de afluentes anaerobios desnitrificantes, donde se ha visto que predominan los organismos de las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae*, la enzima *Msp* I sería la más adecuada para utilizar con la técnica de T-RFLP específica, ya que esta enzima logra cortes diferenciados en las secuencias de los organismos de dichas clases.

Se podría también analizar las secuencias de los OFC con otras enzimas de restricción no utilizadas en este trabajo, para determinar si surge algún otro patrón de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

**Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., Raskin, L. 1996.** The oligonucleotide probe database. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 62, pp. 3557-9.

**Amann, R., Fuchs, B. M., Behrens, S., 2001.** The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridizations. **Curr. Opinion Biotechnol.** vol 12, pp. 231-236.

**Ariesyady, H. D., Ito, T., Okabe, S., 2007.** Functional bacterial and archeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge. **Water Res.**, vol. 41, pp. 1554-1568.

**Barany F., Slatko B., Danzitz M., Cowburn D., Schildkraut I., Wilson G., 1992.** The corrected nucleotide sequences of the *Taq* I restriction and modification enzymes reveal a thirteen-codon overlap. **Gene**, vol. 112, pp. 91-95.

**Bertola, N. Palladino, L, Bevilacqua, A., Zaritzky, N., 1999.** Optimization of the design parameters in an activated sludge system for the wastewater treatment of a potato processing plant. **J. Food Eng.**, vol. 40, pp. 27-33.

**Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.B., Blackall, L.L., 2002.** Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology**, vol. 148, pp. 2309-2318.

**Borzacconi, L., Lopez, I., Passeggi, M., Etchebehere, C., Barcia, R., 2008.** Sludge deterioration in a full scale UASB reactor after a pH drop working under low loading conditions. **Water Sci. Technol.**, vol. 57, pp. 797-802.

**Bossier, P., y Verstraete, W., 1996.** Triggers for microbial aggregation in activated sludge. **Appl. Microbiol. Biothechnol.** vol. 45, pp. 1-6.

**Botero, L.M., Brown, K.B., Brumefield, S., Burr, M., Castenholz, R.W., Young, M., and McDermott, T.R., 2004.** *Thermobaculum terrenum* gen. nov., sp. nov.: a non-phototrophic Gram-positive thermophile representing an environmental clone group

related to the *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) and *Thermomicrobia*. **Arch. Microbiol.**, vol. 181, pp. 269-277.

**Bowman, K.S., Nobre, M.F., da Costa, M.S., Rainey, F.A., Moe, W.M., 2013.** *Dehalogenimonas alkenigignens* sp. nov., a chlorinated-alkane-dehalogenating bacterium isolated from groundwater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 1492-1498.

**Brisson, V., West, K., Lee P., Tringe, S., Brodie, E., Alvarez-Cohen, L., 2012.** Metagenomic analysis of a trichloroethene-degrading microbial community. **The ISME Journal**, vol. 6, pp. 1702-1714.

**Brown, D. R., Whitcomb, R. F., Bradbury, J. M., 2007.** Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 57, pp. 2703-2719.

**Brock, T.D., y Madigan, M.T., 1991.** Microbiología, Sexta Edición. Copyright © 1991 by Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

**Cabezas, A., 2005.** Microbiología de los procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación en la descontaminación de desechos. Tesis de Maestría en Química, PEDECIBA - Facultad de Química - Universidad de la República.

**Cabezas, A., Draper, P., Muxí, L., Etchebehere, C., 2006.** Post treatment of a slaughterhouse waste-water- stability of the microbial community of a Sequencing Batch reactor operated under Oxygen limited conditions. **Water Sci. Technol.**, vol. 54, pp. 215-221.

**Cabezas, A., Draper, P., Etchebehere, C., 2009.** Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 84, pp. 1191-1202.

**Caldera, Y., Madueño, P., Griborio, A., Fernández, N., Gutiérrez, E., 2005.** Effect of the organic load in the performance the UASB reactor treating slaughterhouse effluent. **Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia**, vol. 28, pp. 119-127.

**Cole, J. R., Wang, Q. Cardenas, E. Fish, J. Chai, B. Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M. Marsh, T. Garrity G. M., Tiedje J. M., 2011.** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic. Acids. Res.**, vol. 37, pp. 141-145.

**Cole, J.K., Gieler, B.A., Heisler, D.L., Palisoc, M.M., Williams, A.J., Dohnalkova, A.C., Ming, H., Yu, T.T., Dodsworth, J.A., Li, W.-J., Hedlund, B.P., 2013.** *Kallotenua papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (*Kallotenuales* ord. nov., *Kallotenuaceae* fam. nov.) within the class *Chloroflexia*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 4675-4682.

**Chang, Y., Land, M., Hauser, L., Chertkov, O., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Copeland, A., Tice, H. Cheng, J., Lucas, S., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Mavromatis, K., Liolios, K., Brettin, T., Fiebig, A., Rohde, M., Abt, B., Göker, M., Detter, J., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J., Markowitz, V., 2011.** Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21T). **Standards in Genomic Sciences**, vol. 5, pp. 97-111.

**Chen, J., Shen, Ch., Liu, Ch., 2010.** N-Acetylglucosamine: Production and applications **Mar. Drugs**, vol. 8, pp. 2493-2516.

**Días-Báez, M., Espitia, S., Molina, F., 2002.** Digestión anaerobia una aproximación a la tecnología. UNIBIBLIOS. Bogotá, Colombia.

**Dodsworth, J. A., Gevorkian, J., Despujos, F., Cole, J.K., Murugapiran, S.K., Ming, H., Li, W.-J., Zhang, G., Dohnalkova, A., Hedlund, B.P., 2014.** *Thermoflexus hugenholtzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, filamentous bacterium representing a novel class in the *Chloroflexi*, *Thermoflexia classis* nov., and description of *Thermoflexaceae* fam. nov. and *Thermoflexales* ord. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 64, pp. 2119-2127.

**Eikelboom, D., 2000.** Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA Publishing, London.

**Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Barrandeguy, E., Dabert, P., Moletta, R., Muxí, L., 2001.** Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 35, pp. 259-265.

**Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., Muxí, L., 2002.** Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 40, pp. 97-106.

**Etchebehere, C. y Tiedje, J., 2004.** Diversity and function of uncultured *Chloroflexi* (Green non sulfur Bacteria) in wastewater treatment systems. **International Symposium on Microbial Ecology ISME-10**; Society for Microbial Ecology. Cancún, México.

**Fang, H. H. P., 2000.** Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects. **Water Sci. Technol.**, vol. 42, pp. 201-208.

**Fernandez, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J. A., Amils, R., Sanz, J. L., 2008.** Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. **Chemosphere**, vol. 70, pp. 462-474.

**Gich, F., Garcia-Gil, J., Overmann, J., 2001.** Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. **Arch. Mikrobiol.**, vol. 177, pp. 1-10.

**Gorlenko, V.M., y Lokk, S.I., 1979.** Vertical distribution and characteristics of the species composition of microorganisms from some stratified Estonian lakes. **Mikrobiologiya**, vol. 48, pp. 351-359.

**Gupta, R. S., Chander, P., George, S., 2013.** Phylogenetic framework and molecular signatures for the class *Chloroflexi* and its different clades; proposal for division of the class *Chloroflexia* class. nov. into the suborder *Chloroflexineae* subord. nov., consisting

of the emended family *Oscillochloridaceae* and the family *Chloroflexaceae* fam. nov., and the suborder *Roseiflexineae* subord. nov., containing the family *Roseiflexaceae* fam. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 103, pp. 99-119.

**Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K., Matsuura, K., 1995.** *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 45, pp. 676-681.

**Hanada, S., S. Takaichi, Matsuura, K., Nakamura, K., 2002.** *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium which lacks chlorosomes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 52, pp. 187-193.

**He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.L., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., 2003.** Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. **Nature**, vol. 424, pp. 62-65.

**Hendrickson, E., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C., 2002.** Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 485-495.

**Holt, J.G., y Lewin, R.A., 1968.** *Herpetosiphon aurantiacus* gen. et sp. n., a new filamentous gliding organism. **J. Bacteriol.**, vol. 95, pp. 2407-2408.

**Hoshino, T., Terahana, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y., 2005.** Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. **J. Appl. Microbiol.**, vol. 99, pp. 1165-1175.

**Houghton, K.M., Morgan, X.C., Lagutin, K., MacKenzie, A.D., Vyssotskii, M., Mitchell, K.A., McDonald, I.R., Morgan, H.W., Power, J.F., Moreau, J.W., Hanssen, E., Stott, M.B., 2015.** *Thermorudis pharmacophila* sp. nov., a novel member of the class *Thermomicrobia* isolated from geothermal soil, and emended descriptions of *Thermomicrobium roseum*, *Thermomicrobium carboxidum*, *Thermorudis peleae* and *Sphaerobacter thermophiles*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 65, pp. 4479-4487.

**Hug, L., Beiko, R., Rowe, A., Richardson, R., Edwards, E., 2012.** Comparative metagenomics of three *Dehalococcoides*-containing enrichment cultures: the role of the non-dechlorinating community. **BMC Genomics.**, vol. 13, pp. 327-346.

**Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R., 1998.** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bacteriol.**, vol. 180, pp. 4765-4774.

**Hugenholtz, P. y Stackebrandt, E., 2004.** Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass *Sphaerobacteridae* in the phylum *Actinobacteria* to the class *Thermomicrobia* (emended description) in the phylum *Chloroflexi* (emended description). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 54, pp. 2049-2051.

**Iino, T., Mori, K., Uchino, Y., Nakagawa, T., Harayama, S., Suzuki, K., 2010.** *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 60, pp. 1376-1382.

**Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2000.** Cultivation and *in situ* detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. **App. Environ. Microbiol.**, vol. 66, pp. 3608-3615.

**Imachi, H., Sakai, S., Lipp, J.S., Miyazaki, M., Saito, Y., Yamanaka, Y., Hinrichs, K.-U., Inagaki, F., Takai, K., 2014.** *Pelolinea submarina* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, filamentous bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from subseafloor sediment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 64, pp. 812-818.

**Jackson, T.J., Ramaley, R.F., Meinschein, W.G., 1973.** *Thermomicrobium*, a new genus of extremely thermophilic bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 23, pp. 28-36.

**Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., Wagner, M., 2002.** The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage

treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. **System. Appl. Microbiol.**, vol. 25, pp. 84-99.

**Kale, V., Bjornsdottir, S.H., Fridjonsson, O.H., Petursdottir, S.K., Omarsdottir, S., Hreggvidsson, G.O., in press 2013.** *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of class *Caldilineae*, phylum *Chloroflexi*, isolated from an intertidal hot spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 1149-54.

**Kawaichi, S., Ito, N., Kamikawa, R., Sugawara, T., Yoshida, T., Sako, Y., 2013.** *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the filo '*Chloroflexi*' isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 2992-3002.

**Keppen, O.I., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Ivanovsky, R.N., Gorlenko, V.M., 2000.** Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 50, pp. 1529-1537.

**Kellogg, Ch. A., Lisle, J., Galkiewicz, J., 2009.** Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral *Lophelia pertusa* in the northeastern Gulf of Mexico. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 75, pp. 2294-2303.

**Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004.** Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 1641-1650.

**King, C.E. y King, G.M., 2014a.** *Thermomicrobium carboxidum* sp. nov., and *Thermorudis peleae* gen. nov., sp. nov., y carbon monoxide-oxidizing bacteria isolated from geothermally heated biofilms. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 64, pp. 2586-2592.

**King, C.E. y King, G.M., 2014b.** Description of *Thermogemmatispora carboxidivorans* sp. nov., a carbon-monoxideoxidizing member of the class *Ktedonobacteria* isolated from a geothermally heated biofilm, and analysis of carbon monoxide oxidation by members of the class *Ktedonobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 64, pp. 1244-1251.

**Koizumi, Y., Kojima, H., Fukui, M., 2004.** Dominant microbial composition and its vertical distribution in saline meromictic lake Kaiike (Japan) as revealed by quantitative oligonucleotide probe membrane hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 70, pp. 4930-4940.

**Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., van der Waarde, J., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T. R., Nielsen, P. H., 2007.** Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 59, pp. 671-682.

**Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H., Wagner, M., 1999.** Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. **App. Environ. Microbiol.**, vol. 65, pp. 1289-1297.

**Lewin, R. A., 1970.** New *Herpetosiphon* species (*Flexibacterales*). **Can. J. Microbiol.**, vol. 16, pp. 517-520.

**L'Haridon, S., Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., Tindall, B. J., Spring, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeannot, C., 2006.** *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 56, pp. 1047-1053.

**Liesack, W., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rayney, N., Stackebrandt, E., 1997.** Microbial diversity in soil, the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. **Modern Soil Microbiology** (van Elsas, J.D., Trevors, J.T., y Wellington, E.M.H., Eds.), pp. 375-439. Marcel Dekker, New York.

**Lippel Sant'Anna Jr., G., 2005.** Processos aeróbios de tratamento de matéria orgânica. Reatores e processos. Apresentado em: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis, cap IV.2. Brasil. 18 al 30 de abril de 2005,

**Lin, P.M., Lee, C. H., Roberts, R .J., 1989.** Cloning and characterization of the genes encoding the *Msp* I restriction modification system. **Nucleic. Acids. Res.**, vol 17, pp. 3001-3011.

**Löffler, F.E., Sun, Q., Li, J., Tiedje, J.M., 2000.** 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 66, pp. 1369-1374.

**Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M, Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A. Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M., 2013.** *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 625-635.

**Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., Horn, M., 2007.** ProbeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic. Acids. Res.**, vol. 35, pp. 800-804.

**Martins, A., Pagilla, K., Heijnen, J. J., van Loosdrecht, M., 2004.** Filamentous bulking sludge-a critical review. **Water Res.**, vol. 38, pp. 793-817.

**Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997.** Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. **Science**, vol. 276, pp. 1568-1571.

**Miller G., 1959.** Use of dinitrosalisyc acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, pp. 426-428.

**Miura, Y., y Okabe, S., 2008.** Quantification of cell specific uptake activity of microbial products by uncultured *Chloroflexi* by microautoradiography combined with fluorescence *in situ* hybridization. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 42, pp. 7380-7386.

**Moe, W.M., Yan, J., Nobre, M.F., da Costa, M., Rainey, F., 2009.** *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 59, pp. 2692-2697.

**Morris, R.M., Rappé, M.S., Urbach, E., Connon, S.A., Giovannoni, S.J., 2004.** Prevalence of the *Chloroflexi*-related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 2836-2842.

**Nunoura, T., Hirai, M., Miyazaki, M., Kazama, H., Makita, H., Hirayama, H., Furushima, Y., Yamamoto, H., Imachi, H., Takai, K., 2013.** Isolation and characterization of a thermophilic, obligately anaerobic and heterotrophic marine *Chloroflexi* bacterium from a *Chloroflexi*-dominated microbial community associated with a Japanese shallow hydrothermal system, and proposal for *Thermomarinilinea lacunofontalis* gen. nov., sp. nov. **Microbes Environ.**, vol. 28, pp. 228-235.

**Pierson, B.K., y Castenholz, R.W., 1974.** A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. **Arch. Microbiol.**, vol. 100, pp. 5-24.

**Pierson, B.K., Giovannoni, S.J., Stahl, D.A., Castenholz, R.W., 1985.** *Heliobacterium oregonensis*, gen. nov., sp. nov., a phototrophic filamentous gliding bacterium containing bacteriochlorophyll *a*. **Arch. Microbiol.**, vol. 142, pp. 164-167.

**Podosokorskaya, O.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Novikov, A.A., Kolganova, T.V., Kublanov, I.V., 2013.** *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 86-92.

**Rao, M.S., Muñoz, J. y Stevens, W.F., 2000.** Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. **Appl. Microbiol. Biotech.**, vol. 54, pp. 808-813.

**Rao, M. S. y Stevens, W. F., 2005.** Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, vol. 80, pp 1080-1087.

**Richardson, D., 2000.** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. **Microbiology**, vol. 146, pp. 551-571.

**Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A., 2009.** Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **The ISME Journal**, vol. 3, pp. 700-714.

**Roberts, R. J., Myers, P. A, Morrison, A., Murray, K., A., 1976.** Specific endonuclease from *Haemophilus huemolyticus*. **J. Mol. Biol.**, vol. 103, pp. 199-208.

**Rodriguez, J. A., 2002.** Seminario internacional sobre el tratamiento de aguas residuales y biosólidos. **Ediciones Uniboyaca**.

**Satoh, H., Miura, Y., Tsushima, I., Okabe, S., 2007.** Layered structure of bacterial and archaeal communities and their *in situ* activities in anaerobic granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 73, pp. 7300-7307.

**Schmidell, W., Moreira Soares, H., Etchebehere, C., Menes, R. J., Bertola, N. C., Contreras, E. M. (Ed) 2007.** Tratamiento biológico de águas residuárias. **Editora Tribo da Ilha**. Florianopolis- SC. Brasil.

**Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., Diekmann, H., 1999.** *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. **Int. J. Syst., Bacteriol.**, vol. 49, pp. 1045-1051.

**Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 1999.** Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA- targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in methophilic and thermophilic sludge granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 65, pp. 1280-1288.

**Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 2001.** *In situ* detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 67, pp. 5740-5749.

**Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2003.** *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Candilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 53, pp. 1843-1851.

**Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kijima, J., Kobayashi, T., Morimura, S., Kida, K., 2003.** Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. **J. Biosci. Bioeng.**, vol. 96, pp. 547-558.

**Shyu, J. B. H., Lies, D. P., Newman, D. K., 2002.** Protective role of tolC in efflux of the electron shuttle anthraquinone-2,6-disulfonate. **J. Bacteriol.**, vol. 184, pp. 1806-1810.

**Siggins, A., Enright, A., Abram, F., Botting, C., O'Flaherty, V., 2012.** Impact of trichloroethylene exposure on the microbial diversity and protein expression in anaerobic granular biomass at 37°C and 15°C. **Archaea**, vol. 2012, Article ID 940159.

**Slobodkina, G. B., Panteleeva, A. N., Kostrikina, N. A., Kopitsyn, D. S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Slobodkin, A. I., 2013.** *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage. **Extremophiles**, vol. 17, pp. 833-839.

**Sorokin, D., Lücker, S., Vejmekova, D., Kostrikina, N., Kleerebezem, R., Rijpstra, W I., Damsté, J., Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht M., Daims, H., 2012.** Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a

nitrite-oxidizing bacterium from the filo *Chloroflexi*. **ISME Journal**, vol. 6, pp. 2245-2256.

**Speirs, L, Nittami, T, McIlroy, S, Schroeder, S., Seviour, R.J., 2009.** Filamentous bacterium Eikelboom type 0092 in activated sludge plants in Australia is a member of the filo *Chloroflexi*. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 75, pp. 2446-2452.

**Sun, Y., Zuo, J., Chen, L., Wang, Y., 2008.** *Eubacteria* and *Archaea* community of simultaneous methanogenesis and desnitrification granular sludge. **J. Environ. Sci.**, vol. 20, pp. 626-631.

**Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Matsuura, N., Turlousse, D.M., Meng, X.Y., Tamaki, H., Hanada, S., Cruz, R., Yamaguchi, T., Sekiguchi, Y., 2015.** Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous anaerobic bacterium belonging to the class *Anaerolineae* in the phylum *Chloroflexi*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Doi: 10.1099/ijsem.0.000822. (Epub ahead of print).

**Takaya, N., Catalan-Sakairi, M. A. B., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z., Shoun, H., 2003.** Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 69 pp. 3152–3157.

**Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 28, pp. 2731-2739.

**Travers, D., 2003.** Aplicación de la herramienta molecular *FISH* (Fluorescent *in situ* Hibridization) para la caracterización de comunidades microbianas. Tutor: Dr Rodolfo Javier Menes. Trabajo especial 1 Licenciatura de Bioquímica, Facultad de Ciencias- UDELAR.

**Travers D., 2008.** Reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Maestría en Microbiología aplicada a las ciencias ambientales, Facultad de Ciencias - UDELAR.

**Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J.R., 2007.** Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 73, pp. 5261-5267.

**Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. J., 1963.** Formation of methane by bacterial extracts. **J. Biol. Chem.**, vol. 238., pp. 2882-2886.

**Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2010.** *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of *Thermosporotrachaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria* Cavaletti et al. 2007 and emended description of the class *Ktedonobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 60, pp. 1794-1801

**Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2011.** *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of *Thermogemmatisporaceae* fam. nov. and *Thermogemmatisporales* ord. nov. within the class *Ktedonobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 61, pp. 903-910.

**Yabe, S., Sakai, Y., Yokota, A., 2016.** *Thermosporothrix narukonensis* sp. nov., belonging to the class *Ktedonobacteria*, isolated from fallen leaves on geothermal soil, and emended description of the genus *Thermosporothrix*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 66, pp. 2152-2157.

**Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005.** Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subfilo I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 71, pp. 7493-7503.

**Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006** *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial filo *Chloroflexi*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 56, pp. 1331-1340.

**Yamada, T., y Sekiguchi, Y., 2009.** Cultivation of uncultured *Chloroflexi* subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured *Chloroflexi* “subphylum I” with natural and biotechnological relevance. **Microbes. Environ.**, vol. 24, pp. 205-216.

**Yang, Y. y Zeyer, J., 2003.** Specific detection of *Dehalococcoides* species by fluorescence *in situ* hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 69, pp. 2879-2883.

**Yoon, D., Park, S., Kim, S., Jeon, Ch., Chae, J., Rhee, S., 2010.** Isolation, characterization, and abundance of filamentous members of *Caldilineae* in activated sludge. **The Journal of Microbiology**, vol. 48, pp. 275-283.

**Páginas web consultadas:**

**BLAST:** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**NCBI:** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

**ProbeBase:** <http://www.microbial-ecology.net/probebase>

**RDP:** <http://rdp.cme.msu.edu/>

**Monografías:** [www.monografías.com/trabajos81/diseño-tratamiento-secundario/imagen015.jpg](http://www.monografías.com/trabajos81/diseño-tratamiento-secundario/imagen015.jpg)

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Enriquecimientos

#### Medios de cultivo

Solución traza minerales (g/L); 12,8 Ac. Nitriloacético, 1,35  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,024  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\text{ZnCl}_2$  anhidro, 0,01  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,024  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1,0 molibdato de  $\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,026  $\text{NaCl}$ , 0,12  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,12  $\text{Ni}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Agregar el nitriloacético en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, ajustando el pH a 6,5 con  $\text{KOH}$  10N. Verter en 600 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  disolviendo los compuestos en ese orden, llevar a 1,0 l y guardar bajo de  $\text{N}_2$ .

Solución de vitaminas (mg/L); 2,0 biotina (vit K), 2,0 ác. fólico, 10,0 piridoxina HCl ( $\text{B}_6$ ), 5,0 tiamina HCl ( $\text{B}_1$ ), 5,0 riboflavina ( $\text{B}_2$ ), 5,0 ác. Nicotínico, 5,0 DL-pantotenato de Ca, 0,1 cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ ), 5,0 paraminobenzioco, 5,0 ác. tioctico (lipoico).

Solución de Ca y Mg (g/L); 7,5  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11,6  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3,72  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 6,0  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Solución de extracto celular; Para preparar el extracto celular usado como sustrato se tomaron 20 mL del lodo extraído del reactor previa agitación. Luego de dejarlo decantar 1 día, se descartó el sobrenadante con jeringa completando el volumen hasta 20 mL con agua. Los viales con las soluciones fueron luego gaseados en atmósfera de  $\text{N}_2$  y se esterilizaron en autoclave a 1,1 atm por 15 min. Se sembraron controles en placa de las soluciones esterilizadas que dieron negativo y se sometieron nuevamente a esterilización en autoclave en las mismas condiciones.

#### Determinación de NAG por la medida de azúcares reductores con DNS

Esta consistía en tomar 0,3 mL de muestra y adicionarle 0,9 mL de solución de DNS, mezclarlos en Vortex y hervirlos por 5 min. Luego adicionarles 6,0 mL de agua, mezclarlos en Vortex nuevamente y finalmente medir la absorbancia a  $\lambda = 540$  nm. La determinación de la concentración de NAG en los viales se realizó midiendo la absorbancia del medio y luego se interpolaba en una curva de calibración construida a partir de soluciones con concentraciones conocidas de NAG, a las que se les realizó la misma técnica de determinación de azúcares.

Solución de DNS; preparar en campana; 5 g DNS en 250 mL de agua tibia, agregar 100 mL de  $\text{NaOH}$  2N recién preparada, 50g tartrato doble de Na y K, llevando a 500 mL con agua.

### 1.1 Sustrato Extracto de Levadura;

**Tabla 26a:** Observación macroscópica de los viales 1 al 3 con Extracto de Levadura como sustrato.

**Tabla 26b:** Observación macroscópica de los viales 4 al 6 con Extracto de Levadura como sustrato y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones.

### 1.2 Sustrato Extracto Celular;

**Tabla 27a:** Observación macroscópica de los viales 7 al 9 con Extracto Celular como sustrato.

**Tabla 27b:** Observación macroscópica de los viales 10 al 12 con Extracto Celular como sustrato y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones.

**Tabla 27c:** Observación macroscópica de los viales 7' al 9' con Extracto Celular como sustrato.

**Tabla 27d:** Observación macroscópica de los viales 10' al 12' con Extracto Celular como sustrato y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones.

**Tabla 27e:** Observación macroscópica de los diferentes blancos.

### 1.3 Sustrato NAG;

**Tabla 28a:** Medidas de absorbancia de los viales, y cálculo de la concentración de NAG.

**Tabla 28b:** Observación macroscópica de los viales A1 al A3, C7 al C9 y B7 al B9 con NAG como sustrato.

**Tabla 28c:** Observación macroscópica de los viales A4 al A6, C10 al C12 y B10 al B12 con NAG y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones.

**Tabla 28d:** Esquema de tomas de muestra para *FISH* y ADN.

**Tabla 28e:** Medida de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

**Fig. 16:** Fotografías de los enriquecimientos y cultivos realizados.

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto de lev. 100 g/L (1 ml)	Observación macroscópica
8	1	X	Crecimiento, con gas
	2	X	Crecimiento, con gas
	3	X	Crecimiento, con gas
15	1	-	Crecimiento, con gas
	2	-	Crecimiento, con gas
	3	-	Crecimiento, con gas
48	1	X	Crecimiento, con gas
	2	X	Crecimiento, con gas
	3	X	Crecimiento, con gas, medio ácido
79	1	-	Crecimiento, con gas, medio ácido
	2	-	Crecimiento, con gas, medio ácido
	3	-	Crecimiento, con gas, medio ácido
92	1	X	Medio amarillo. Lodo suelto amarillento
	2	X	Medio amarillo-verdoso, lodo amarillo-verdoso
	3	X	Medio verdoso-amarillo, lodo verde-amarillo.
125	1	-	Mucho gas, medio ácido
	2	-	Mucho gas, medio ácido
	3	-	Mucho gas, medio ácido

**Tabla 26a.** Observaciones macroscópicas de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato. Se indica cuando fueron alimentados con una X. Se determinó la acidez del medio por tirilla reactiva de medida de pH (valores entre 5 y 6).

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto de lev. 100 g/L (1 ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1M (0,5ml)	Observación macroscópica
8	4	X	X	Crecimiento, consumo de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , sin NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , con gas
	5	X	X	Crecimiento, consumo de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , sin NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , con gas
	6	X	X	Crecimiento, consumo de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , sin NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , con gas
15	4	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
	5	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
	6	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
48	4	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
	5	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
	6	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , con gas
92	4	X	X	Medio amarillento + claro, lodo blancuzco-amarillento espumoso y suelto, medio ácido, con gas
	5	X	X	Medio amarillento + claro, lodo blancuzco-amarillento espumoso y suelto, medio ácido, con gas
	6	X	X	Medio amarillento + claro, lodo blancuzco-amarillento espumoso y suelto, medio ácido, con gas
125	4	-	-	Con gas, medio ácido
	--	--	--	--
	6	-	-	Con gas, medio ácido

**Tabla 26b.** Observaciones macroscópicas de los enriquecimientos con Extracto de Levadura como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones. Se indica cuando fueron alimentados con una X. Se determinó la acidez del medio por tirilla reactiva de medida de pH (valores entre 5 y 6). El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se determinó por tirilla reactiva (QUANTOFIX®).

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto celular 26 mM (1 ml)	Observación macroscópica
8	7	X	Medio amarillento, lodo negro algo agregado
	8	X	
	9	X	
15	7	---	Medio amarillento, lodo negro algo agregado
	8	---	
	9	---	
48	7	X	Medio amarillento, lodo negro algo agregado
	8	X	
	9	X	
79	7	X	Medio verdoso, lodo negro algo menos agregado
	8	X	
	9	X	
92	7	---	Medio verdoso-amarillent, lodo negro suelto (desprendido)
	8	---	
	9	---	
114	7	X	Medio verdoso-amarillent, lodo negro suelto (desprendido)
	8	X	
	9	X	
125	7	---	Medio verdoso, lodo negro suelto (desprendido)
	8	---	
	9	---	
138	7	X	Medio grisáceo, lodo negro suelto (desprendido)
	8	X	
	9	X	
147	7	---	Medio verde amarillento, lodo negro algo agregado
	8	---	
	9	---	

**Tabla 27a.** Continúa en la siguiente hoja.

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto celular 26 mM (1 ml)	Observación macroscópica
175	7	X	Medio verde amarillento, lodo negro que desprende algo agregado Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
192	7	X	Medio verdoso amarillento, lodo negro desprende algo agregado Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
223	7	X	Medio verdoso grisáceo, lodo negro menos agregado Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
251	7	X	Medio verdoso grisáceo, lodo negro, desprende fácilmente en biofilm, precipita rápidamente Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
268	7	---	Medio verdoso, lodo negro, desprende en biofilm, al agitar queda algo en suspensión que finalmente ppta. Ídem Ídem, con cristales con forma de agujas dorados sobre el lodo
	8	---	
	9	---	
274	7	X	Medio verdoso, lodo negro agregado, al agitar queda algo en suspensión y finalmente presipita Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
377	7	X	Medio verde, lodo negro, capa superficial desprende fácilmente, la inferior desprende en biofilm con movimiento ondulados, precipita bien, con pequeños grumos negros Ídem Ídem
	8	X	
	9	X	
478	7	X	Medio gris-verdoso y traslúcido, lodo desprende con movimientos ondulados (agregado), con grumos negros Ídem Ídem, con cristales dorados
	8	X	
	9	X	

**Tabla 27a.** Observación macroscópica de los enriquecimientos con Extracto Celulare como sustrato viales del 7 al 9. Se indica el tiempo de incubación, así también con una X cuando fueron alimentadas en el casillero correspondiente.

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto Celular 26 mM (1 ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1M (0.2ml)	Observación macroscópica
8	10	X	X	Medio algo rosado, lodo agregado
	11	X	X	Ídem
	12	X	X	Ídem
15	10	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , lodo agregado
	11	X	-	Medio algo rosado, lodo grisáceo agregado
	12	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
48	10	X	-	Medio algo rosado,
	11	-	X	Se consumió el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	12	X	-	Medio algo rosado
79	10	X	-	Medio rosado
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem
92	10	X	-	Medio rosado, lodo grisáceo agregado
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem
125	10	X	-	Medio algo rosado, lodo grisáceo agregado
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem
138	10	X	-	Medio algo rosado con lodo gris
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem
147	10	X	-	Medio algo rosado con lodo beige grisáceo
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem

**Tabla 27b.** Continúa en la siguiente hoja.

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto Celular 26 mM (1 ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1M (0.2ml)	Observación macroscópica
175	10	X	-	Medio rosado grisáceo, lodo beige grisáceo
	11	X	-	Ídem
	12	X	-	Ídem
192	10	X	-	Medio rosa, lodo crema grisáceo poco agregado
	11	X	X	Medio grisáceo verdoso, lodo negro poco agregado
	12	X	-	Medio rosa, lodo crema grisáceo poco agregado
223	10	X	-	Medio levemente rosado, lodo grisáceo, que se mueve en ondas (agregado)
	11	X	X	Medio grisáceo verdoso, lodo negro, que se mueve en ondas (agregado)
	12	X	X	Medio verdoso grisáceo-lodo grisáceo oscuro
251	10	X	X	Medio grisáceo, lodo beige oscuro, desprende en ondas (agregado)
	11	X	X	Medio grisáceo, lodo marrón-beige oscuro, desprende en ondas más marcadas (mas agregado)
	12	X	-	Medio rosado- lodo beige oscuro
268	10	-	-	Medio rosado, marrón-beige oscuro
	11	-	X	Medio grisáceo, lodo negro
	12	-	-	Medio rosado, lodo marrón-beige oscuro
274	10	X	-	Medio rosado, lodo gris con un poco de gas al pinchar
	11	X	-	ídem
	12	X	-	ídem
377	10	X	X	Medio amarillento, lodo crema oscuro desprende en ondas más suelto (menos agregado) pequeños grumos marrones
	11	X	X	Ídem
	12	X	X	Ídem
478	10	X	X	Medio amarillento, lodo crema oscuro desprendido (menos agregado)
	11	X	X	Ídem
	12	X	X	Ídem

**Tabla 27b continuación.** Observación macroscópica de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones (viales 10 al 12). Se indica el tiempo de incubación en días y cuando fueron alimentado con una X en el casillero correspondiente.

* t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto Celular 26 mM 1 ml)	Observación macroscópica
13	7'	X	Medio grisáceo, lodo agregado
	8'	X	Ídem
	9'	X	Ídem
22	7'	-	Medio amarillento-verdoso y lodo grisáceo
	8'	-	Medio amarillento-más verdoso y lodo grisáceo
	9'	-	Ídem
50	7'	X	Medio verdoso claro-amarillento, lodo grisáceo agregado
	8'	X	Medio verdoso más oscura-amarillento, lodo grisáceo agregado
	9'	X	Medio verdoso oscura-amarillento, lodo grisáceo agregado
67	7'	X	Medio verdoso amarillento, lodo gris con muchos grumos negros y que desprende agregado
	8'	X	Ídem
	9'	X	Ídem
98	7'	X	Medio grisáceo, lodo grisáceo desprende en ondas (agregado)
	8'	X	Ídem
	9'	X	Medio grisáceo, lodo negro desprende en ondas (agregado)
126	7'	X	Medio grisáceo, lodo beige, con grumos negros, agregado, precipita fácilmente
	8'	X	Medio grisáceo, lodo beige-negro, con grumos negros, agregado, precipita fácilmente
	9'	X	Medio grisáceo, lodo negro, con grumos negros agregado, precipita fácilmente
143	7'	X	Medio grisáceo, lodo gris, con grumos negros, desprende en ondas (agregados), al agitar quedan agregados, que precipitan pero algo queda en suspensión
	8'	X	Ídem con lodo un poco más oscuro
	9'	X	Ídem con lodo más oscuro, casi como viales 7,8,y 9
252	7'	X	Medio verdoso, lodo gris oscuro con grumos negros desprenden en ondas (agregado) al agitar queda algo en suspensión
	8'	X	Medio verdoso, lodo negro-grisáceo desprende en ondas (agregado)
	9'	X	Ídem
353	7'	X	Medio grisáceo opaco, lodo oscuro que se desprende con grumos negros
	8'	X	Ídem
	9'	X	Ídem

**Tabla 27c.** Observación macroscópica de los enriquecimientos del 7 'al 9' con Extracto Celular como sustrato, que fueron subcultivados de los viales 7 al 9 originales (cuando esto últimos tenían 125 días de incubación). Se indica con una X cuando fueron alimentadas en el casillero correspondiente.

t(días) incubación	Nº del Vial	Extracto Celular 26 mM 1 ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1M (0.2ml)	Observación macroscópica
13	10'	X	X	Medio grisáceo con lodo agregado
	11'	X	X	Ídem
	12'	X	X	Ídem
22	10'	X	X	Medio color crema, con lodo agregado
	11'	X	X	Ídem
	12'	X	X	Ídem
50	10'	X	X	Medio incoloro, lodo blanco grisáceo agregado
	11'	X	X	Ídem
	12'	X	X	Ídem
67	10'	X	X	Medio amarillento verdoso, lodo crema con algunos grumos negros y mas agregado
	11'	X	X	Ídem
	12'	X	X	Ídem
98	10'	X	X	Medio verdoso, lodo gris-negro se mueve en ondas (agregado)
	11'	X	X	Medio verdoso, lodo beige con grumos negros y mueve en ondas (agregado)
	12'	X	X	Ídem
126	10'	X	X	Medio verdoso, lodo beige con grumos grandes negros
	11'	X	X	Medio incoloro, lodo beige-naranja con grumos negros
	12'	X	X	Ídem
143	10'	X	-	Medio rosado, lodo gris, se mueve en ondas más marcadas, con grumos, al agitar precipita bien
	11'	X	-	Ídem
	12'	X	-	Ídem
149	10'	X	-	Medio rosado, lodo gris, agregado, con grumos, al agitar precipita bien
	11'	X	-	Ídem
	12'	X	-	Ídem
252	10'	X	X	Medio amarillo, lodo marrón-grisáceo con grumos negros grandes y agregado
	11'	X	-	Medio rosado, lodo beige con grumos negros grandes que no de desagregan al agitar
	12'	X	X	Medio amarillo, lodo beige se mueve en ondas (agregado) con grumos negros
353	10'	X	X	Medio amarillo, lodo crema con grumos negro
	11'	X	-	Medio rosado, lodo crema más oscuro que viales 10 y 12, con grumos negros
	12'	X	-	Medio rosado, lodo crema más oscuro que los viales 10 y 12, con grumos negros

**Tabla 27d.** Observación macroscópica de los enriquecimientos 10' al 12' subcultivados de los viales 10 al 12 originales (cuando éstos últimos tenían 125 días de incubación) con Extracto Celular como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones. Se indica con una X cuando fueron alimentados en los casilleros correspondientes.

t(días) inc.	Blanco	composición	Observación macroscópica
92	<b>BL 1</b>	Lodo	Medio amarillo-verdoso, lodo grisáceo suelto
125	<b>BL 1</b>	Lodo	Medio amarillo-verdoso, lodo gris-verdoso
138	<b>BL 1</b>	Lodo	Medio amarillo verdoso, lodo gris-verdoso
175	<b>BL 1</b>	Lodo	Medio amarillo-verdoso, lodo gris-amarillento
267	<b>BL 1</b>	Lodo	Medio traslúcido verdoso, lodo verdoso con unos pocos grumos negros
88	<b>BL 2</b>	Lodo + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Medio rosado, lodo blanco-grisáceo suelto
268	<b>BL 2</b>	Lodo + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Medio traslúcido rosado, lodo blanco-grisáceo con unos pocos grumos negros
114	<b>BL 5</b>	Extracto celular	Medio rosado, lodo blanco-grisáceo
138	<b>BL 5</b>	Extracto celular	Medio rosado, lodo blanco-grisáceo
267	<b>BL 5</b>	Extracto celular	Medio rosado, con lodo esponjoso blanco con agujas doradas
175	<b>BL 6</b>	Extracto celular + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Medio rosado, lodo adherido blanco-grisáceo con agujas doradas brillosas
267	<b>BL 6</b>	Extracto celular + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Medio rosado con burbujas, lodo blanco esponjoso, con agujas doradas
147	<b>BL 7</b>	Lodo´	Medio transparente, lodo crema con grumos negro, que se desprende en ondas (agregado)
147	<b>BL 8</b>	Lodo´+ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Medio rosado, lodo crema con grumos negros

**Tabla 27e.** Observación de los blancos de los enriquecimientos con Extracto Celular como sustrato. Lodo: lodo de la entrada a la laguna con el que se inocularon los viales 1 al 12. Extracto celular: lodo de la entrada a la laguna esterilizado por autoclave. Lodo´: lodo subcultivado a los 125 días de incubación del vial 7. Lodo´+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: lodo subcultivado a los 125 días de incubación del vial 10.

Viales	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	Abs prom <sub>1-2</sub>	t <sub>(d)</sub>	conc. calc.	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	Abs prom <sub>1-2</sub>	t <sub>(d)</sub>	conc. calc.
A1	-	0,005	0,004	0,0045	45	<100	0,006	0,004	0,005	54	<100
A2	-	0,002	0	0,001		<100	0,005	0,007	0,006		<100
A3	-	0,001	0,002	0,0015		<100	0,004	0,004	0,004		<100
A4	+	0,195	0,195	0,195	45	751,33	0,002	0,001	0,0015	54	<100
A5	+	0,179	0,179	0,179		698,00	0,006	0,004	0,005		<100
A6	+	0,054	0,054	0,054		281,33	0,004	0,005	0,0045		<100
C7	-	0,206	0,204	0,205	45	784,67	0,004	0,003	0,0035	54	<100
C8	-	0,133	0,14	0,1365		556,33	0,006	0,006	0,006		<100
C9	-	0,145	0,147	0,146		588,00	---	---	---		---
C10	+	0,003	0,001	0,002	45	<100	0,002	0,001	0,0015	54	<100
C11	+	0,08	0,045	0,0625		309,67	0,004	0,002	0,003		<100
C12	+	0,003	0,003	0,003		<100	---	---	---		---
B7	-	0,229	0,176	0,2025	12	776,33	0,002	0,003	0,0025	21	<100
B8	-	0,117	0,151	0,134		548,00	---	---	---		---
B9	-	0,146	0,14	0,143		578,00	---	---	---		---
B10	+	0,384	0,394	0,389	12	1398,00	0,003	0,003	0,003	21	<100
B11	+	0,217	0,224	0,2205		836,33	---	---	---		---
B12	+	0,216	0,212	0,214		814,67	---	---	---		---

**Tabla 28a.** Medida de las absorbancias en los diferentes enriquecimientos de NAG, cálculo de las respectivas concentraciones de NAG en µg/ml extrapoladas de la curva de calibración de la fig. 3. La presencia o ausencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los viales, se indica con un + ó -. conc. calc.: concentración calculada. t<sub>(d)</sub>: tiempo de incubación de los viales en días.

t(días) incubación	Nº del Vial	Sustrato NAG	Observación macroscópica
32	A1	X	Medio traslúcido beige, lodo beige-grisáceo algo esponjoso
	A2	X	Ídem
	A3	X	Ídem con lodo más esponjoso
49	A1	---	Medio traslúcido beige, lodo beige-grisáceo algo esponjoso, sin gas
	A2	---	Ídem
	A3	---	Ídem, con lodo más esponjoso
58	A1	---	Medio traslúcido beige, lodo beige-grisáceo, algo de gas
	A2	---	Ídem
	A3	---	Ídem
* 32	C7	X	Medio algo turbio, lodo grisáceo
	C8	X	Medio menos turbio, lodo grisáceo más oscuro
	C9	X	Medio traslúcido, lodo grisáceo más oscuro
* 49	C7	---	Medio turbio, con gas, lodo negro
	C8	---	Ídem
	C9	---	Ídem
* 58	C7	---	Medio turbio, sin gas, lodo negro
	C8	---	Ídem
	C9	---	Ídem
** 16	B7	---	Medio incoloro, con gas, lodo beige
	B8	---	Ídem
	B9	---	Medio incoloro, con gas, lodo más negruzco
** 24	B7	X	Medio turbio, sin gas, lodo beige
	B8	X	Ídem
	B9	X	Medio turbio, sin gas, lodo negro

**Tabla 28b.** Esquema de las observaciones macroscópicas realizadas en los viales con NAG como sustrato. Se indica con una X en el cuadro respectivo los días en que se alimentaron. \* Los viales C fueron subcultivados de los viales 7, 8 y 9 originales con extracto celular como sustrato, a los 191 días de incubación. \*\* Los viales B fueron subcultivados de los viales 7', 8' y 9' con extracto celular como sustrato a los 99 días de incubación (es de considerar que estos últimos a su vez fueron subcultivados de los viales 7, 8, y 9 originales, con extracto celular como sustrato a los 125 días de incubación).

t(días) incubación	Nº del Vial	Sustrato NAG	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Observación macroscópica
32	A4	X	X	Lodo beige algo esponjoso
	A5	X	X	Lodo beige con grumos grandes marrones
	A6	X	X	Ídem
49	A4	---	---	Medio rosado, lodo beige con grumos marrones
	A5	---	---	Medio rosado, lodo beige-grisáceo con grumos negros
	A6	---	X	Medio incoloro, lodo beige-grisáceo con grumos negros
58	A4	---	X	Medio transparente, lodo beige con grumos marrones
	A5	---	-	Medio rosado, beige-grisáceo con grumos marrones
	A6	---	-	Medio rosado, lodo beige con grumos marrones
* 32	C10	X	X	Medio algo turbio, lodo naranja
	C11	X	X	Medio algo turbio, lodo grisáceo
	C12	X	X	Medio algo turbio, lodo naranja
* 49	C10	---	-	Medio incoloro, con gas, lodo beige
	C11	---	-	Ídem
	C12	---	-	Ídem
* 58	C10	---	X	Medio incoloro, sin gas, lodo beige
	C11	---	X	Ídem
	C12	---	X	Ídem
** 16	B10	---	X	Medio incoloro, con gas, turbios, lodo beige
	B11	---	-	Medio rosado, con gas, turbios, lodo beige
	B12	---	-	Ídem
** 24	B10	X	X	Medio incoloro, sin gas, lodo beige
	B11	X	-	Medio rosado, poco gas, lodo beige
	B12	X	-	Medio rosado, muy poco gas, lodo beige

**Tabla 28c.** Esquema de las observaciones macroscópicas realizadas en los viales con NAG como sustrato y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones. Se indica con una X en el cuadro respectivo los días en que se alimentaron. \* Los viales C fueron subcultivados de los viales 10, 11, y 12 originales con extracto celular como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones, a los 191 días de incubación. \*\* Los viales B fueron subcultivados de los viales 10', 11' y 12' con extracto celular como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones, a los 99 días de incubación (es de considerar que estos últimos a su vez fueron subcultivados de los viales 10', 11' y 12' originales, con extracto celular como sustrato y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones, a los 125 días de incubación).

Viales	$t_{(días)} FISH$ ; $t_{(días)} ADN$		
A1 A2 A3	32 ; s/m <sub>ADN</sub>	203 ; s/m <sub>ADN</sub>	261 (G) ; 261
A4 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) A5 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) A6 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	32 ; s/ m <sub>ADN</sub>	203 ; s/ m <sub>ADN</sub>	261 (G) ; 261
* C7 * C8 * C9	32 ; s/ m <sub>ADN</sub>	203 ; s/ m <sub>ADN</sub>	261 (G) ; 261
* C10 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) * C11 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) * C12 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	32 ; s/ m <sub>ADN</sub>	203 ; s/ m <sub>ADN</sub>	261 (G) ; 261
** B7 ** B8 ** B9	197 (G) ; 197	---	---
** B10 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) ** B11 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) ** B12 (con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	197 (G) ; 197	---	---

**Tabla 28d.** Esquema que detalla las muestras que se fijaron para *FISH* y las que se extrajeron para ADN, donde se indican los días de incubación que tenían los enriquecimientos respectivos al momento de realizarlas.  $t_{(días)} FISH$ : días de incubación que tenían los enriquecimientos al fijar las muestras para *FISH*.  $t_{(días)} ADN$ : días de incubación que tenían los enriquecimientos al hacer las tomas de muestras para ADN. (G) indica las muestras en las que se fijó para *FISH* sobre portaobjeto con gelatina. s/ m<sub>ADN</sub> sin muestra para ADN. \* Los viales C fueron subcultivados de los viales 7 al 12 originales con extracto celular como sustrato a los 191 días de incubación. \*\* Los viales B fueron subcultivados de los viales 7', al 12' con extracto celular como sustrato a los 99 días de incubación (es de considerar que estos últimos habían sido subcultivados a su vez de los viales 7 al 12 originales, con extracto celular como sustrato a los 125 días de incubación).

Muestra	Dilución	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ppm N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ppm N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
A4	10	0	0	0	0
A5	1	0	0	11574	124,60
A6	10	0	0	9818	105,3
B10	1	0	0	0	0
B11	1	0	0	8523	9,1
B12	1	4372	8,0	38762	42,4
B12	10	375	8,0	3384	34,5
C10	10	0	0	0	0
C11	1	0	0	0	0
C12	1	0	0	0	0

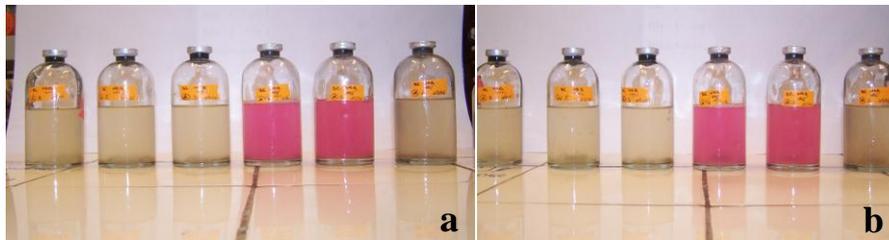
**Tabla 28e.** Medidas de las concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por HPLC en los enriquecimientos y subcultivos de NAG con 54 días de incubación para los viales A y C y 20 días de incubación para los viales B. ppm: partes por millón.



**Fig. 16a.** Observación macroscópica de los viales 7 al 12 en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 268 días de incubación. Estos enriquecimientos tenían como sustrato Extracto Celular y las muestras de lodos fueron tomadas de un reactor SBR.



**Fig. 16b.** Observación macroscópica de los viales subcultivados 7' al 12', en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 268 días de incubación. Estos enriquecimientos tenían como sustrato Extracto Celular y los lodos fueron subcultivados de los viales 7 al 12.



**Fig. 16c.** Observación macroscópica de los viales A1 al A6, en reposo (a) y luego de agitación (b) a los 49 días de incubación. Estos enriquecimientos tenían como sustrato NAG y las muestras de lodos fueron tomadas de un reactor SBR.



**Fig. 16d.** Fotografía del cultivo de los enriquecimientos en estufa a 30 °C.

## **Anexo 2. Biblioteca de clones**

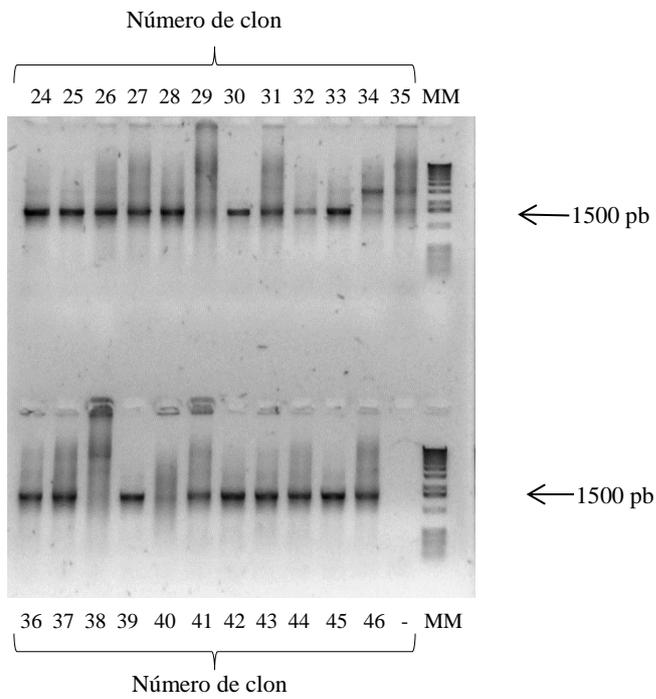
### 2.1 PCR;

**Fig. 17:** Foto de corrida electroforética de amplificadores del gen de ARNr 16S de la placa N1.

### 2.2 ARDRA;

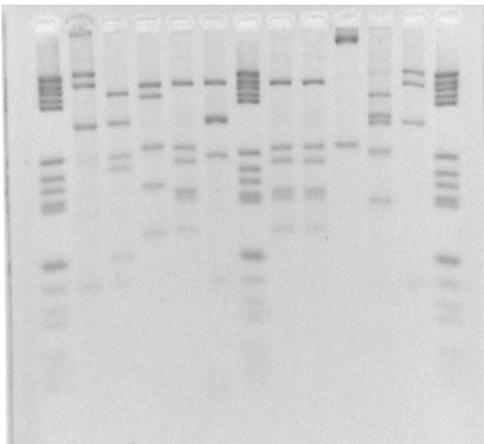
**Fig. 18:** Foto de corrida electroforética con diferentes perfiles de la placa N1.

**Fig. 19:** Análisis de los perfiles obtenidos por GelCompar de la placa N1.

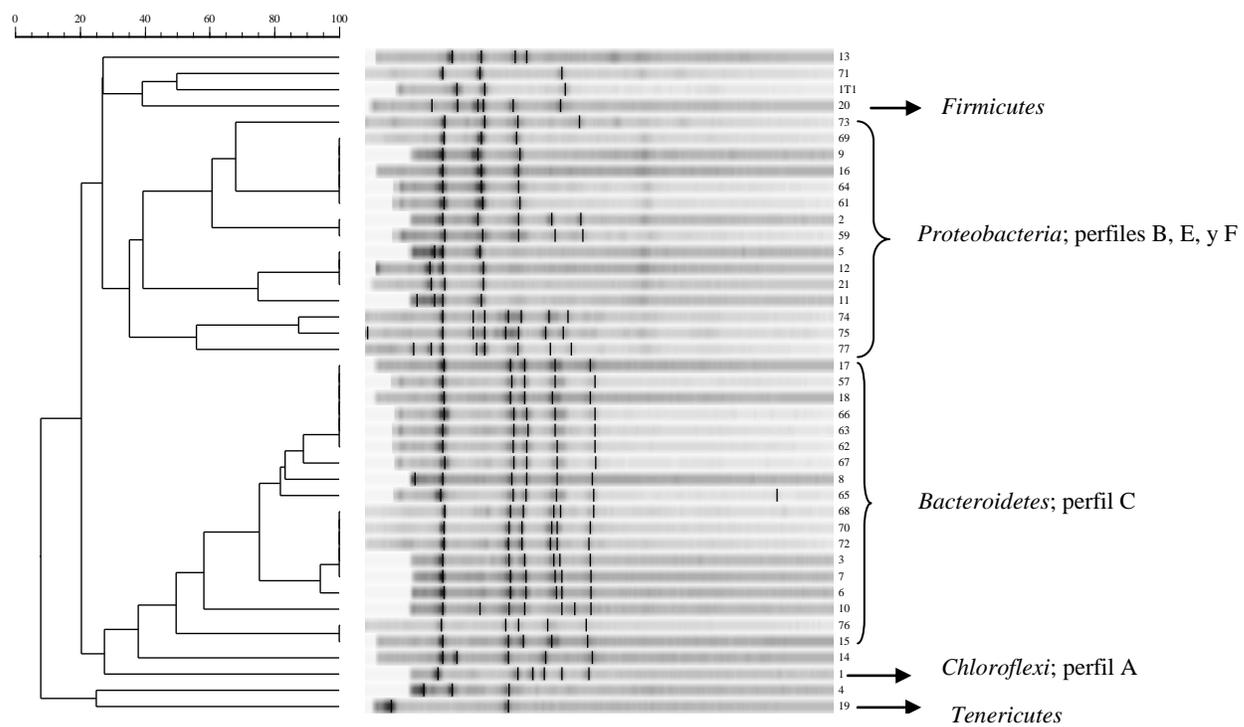


**Fig. 17.** Fotografía de una corrida electroforética de uno de los geles de los productos de amplificación por PCR, de las secuencias de los clones indicados de la placa **N1**. MM marcador de peso molecular de 1kb. Las flechas indican los 1500 pb.

MM 12 13 14 15 16 MM 17 18 19 20 21 MM



**Fig. 18.** Fotografía de una corrida electroforética con diferentes perfiles de restricción (ARDRA) de secuencias de la placa **N1**. El número del clon si indica en la parte superior. MM marcador de peso molecular N° V (Roche Gmb).



**Fig. 19.** Análisis de los geles de ARDRA de la placa N1 con el programa GelCompar (versión 4.2; Applied Maths 1992-1997, Kortrijk, Belgium).

### **Anexo 3. Análisis Bioinformáticos**

Tablas y gráficas con los diferentes % de detección de secuencias de las diferentes sondas.

**Tabla 29a.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de microorganismos detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **GNSB941**.

**Tabla 29b.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **GNSB941**.

**Tabla 30a.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de microorganismos detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **CFX1223**.

**Tabla 30b.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **CFX1223**.

**Fig. 20a:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **CFX1A331**.

**Fig. 20b:** Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda **CFX1A331**.

**Fig. 21a:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **CFX784**.

**Fig. 21b:** Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda **CFX784**.

**Fig. 22:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **CFX197**.

**Fig. 23a:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **GNSB633**.

**Fig. 23b:** Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda **GNSB633**.

**Fig. 24a:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **CFX109**.

**Fig. 24b:** Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda **CFX109**.

**Fig. 25a:** Secuencias de microorganismos detectados por la sonda **Dhe125t**.

**Fig. 25b:** Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda **Dhe125t**.

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	2636371	26748	1,01
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	25255	68,33
<i>Anaerolineae</i>	19740	14058	71,22
<i>Caldilineae</i>	1094	489	44,70
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	1569	73,84
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	1517	61,57
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	808	39,05
<i>Thermomicrobia</i>	885	289	32,66
no clasificados	8582	6525	76,03

**Tabla 29a.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de los OFC aisladas y no cultivadas detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **GNSB941**. Información de la base de datos ProbeBase.

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	360273	194	0,1
Filo <i>Chloroflexi</i>	259	194	74,9
<i>Anaerolineae</i>	49	21	42,9
<i>Caldilineae</i>	15	13	86,7
" <i>Chloroflexi</i> "	75	57	76,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	40	97,6
<i>Ktedonobacteria</i>	26	23	88,5
<i>Thermomicrobia</i>	24	18	75,0
no clasificados	29	22	75,9

**Tabla 29b.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **GNSB941**. Información de la base de datos ProbeBase.

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	2636371	26230	1,026
Filo <i>Chloroflexi</i>	36959	24786	67,064
<i>Anaerolineae</i>	19740	14757	74,757
<i>Caldilineae</i>	1094	405	37,020
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	1028	48,376
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	1253	50,852
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	762	36,829
<i>Thermomicrobia</i>	885	232	26,215
no clasificados	8582	6349	73,980

**Tabla 30a.** Detalle de la cantidad y porcentaje de las secuencias de OFC aisladas y no cultivadas detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **CFX1223**. Información de la base de datos ProbeBase.

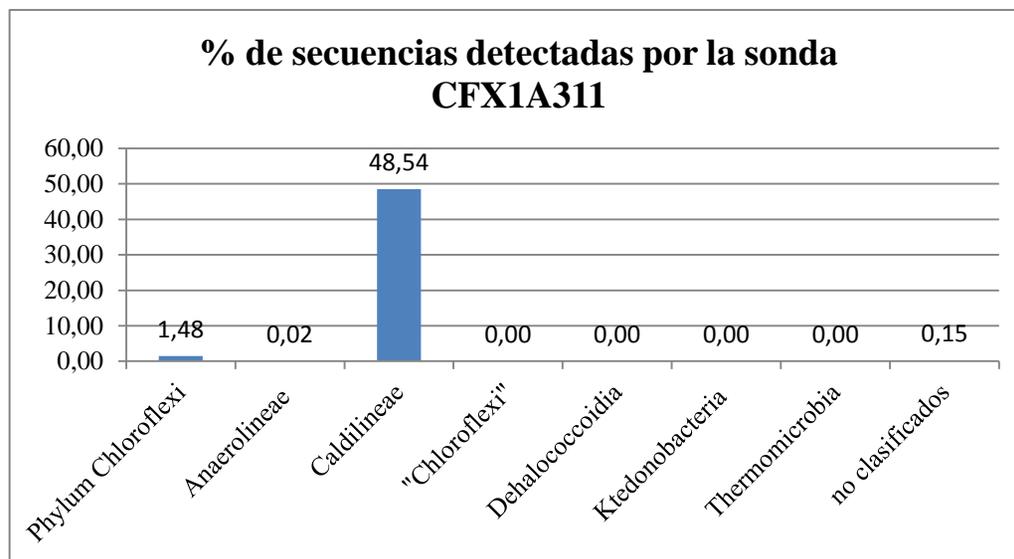
Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	393954	187	0,1
Filo <i>Chloroflexi</i>	259	176	68,0
<i>Anaerolineae</i>	49	20	40,8
<i>Caldilineae</i>	15	6	40,0
" <i>Chloroflexi</i> "	75	54	72,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	41	100,0
<i>Ktedonobacteria</i>	26	23	88,5
<i>Thermomicrobia</i>	24	13	61,9
no clasificados	29	19	65,5

**Tabla 30b.** Detalle de la cantidad y porcentaje de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda del filo *Chloroflexi* **CFX1223**. Información de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda CFX1A331

CFX1A331	Clase <i>Candelineae</i>	331-348	Sonda: 5' CCCC GTAGGAGTCGGGAC 3' Blanco: 5' GTCCCGACTCCTACGGGG 3'
----------	--------------------------	---------	--

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	2636371	578	0,02
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	547	1,48
<i>Anaerolineae</i>	19740	3	0,02
<i>Caldilineae</i>	1094	531	48,54
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	0	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	0	0,00
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	0	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	885	0	0,00
no clasificados	8582	13	0,15

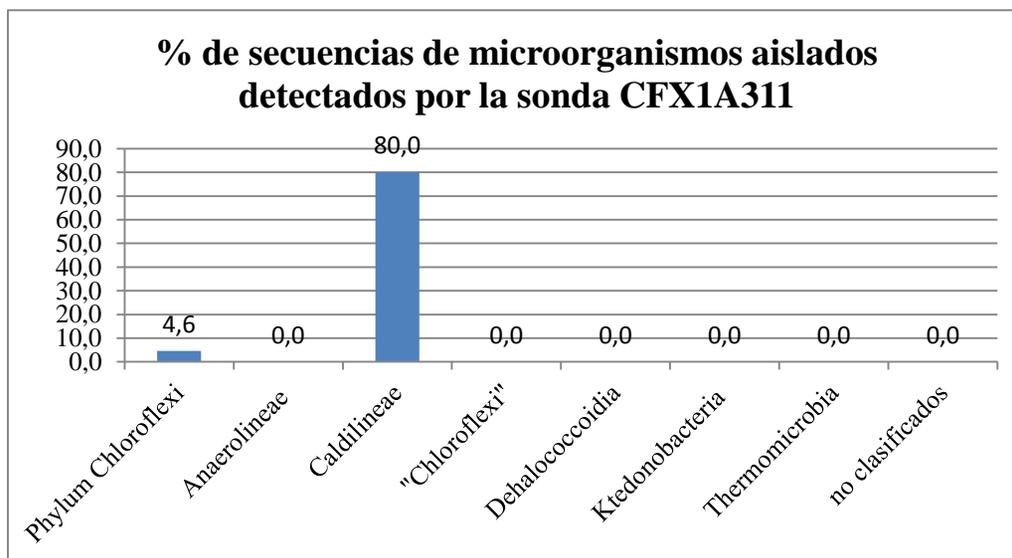


**Fig. 20a.** Porcentajes de secuencias de OFC aislados y no cultivados detectados por la sonda **CFX1A311**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda CFX1A331

CFX1A331	Clase <i>Candelineae</i>	331-348	Sonda: 5' CCCCCTAGGAGTCGGGAC 3' Blanco: 5' GTCCCGACTCCTACGGGG 3'
----------	--------------------------	---------	---

Microorganismos	Totales	Ddetectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	393954	12	0,003
Phylum <i>Chloroflexi</i>	259	12	4,6
<i>Anaerolineae</i>	49	0	0,0
<i>Caldilineae</i>	15	12	80,0
"Chloroflexi"	75	0	0,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	0	0,0
<i>Ktedonobacteria</i>	26	0	0,0
<i>Thermomicrobia</i>	24	0	0,0
no clasificados	29	0	0,0

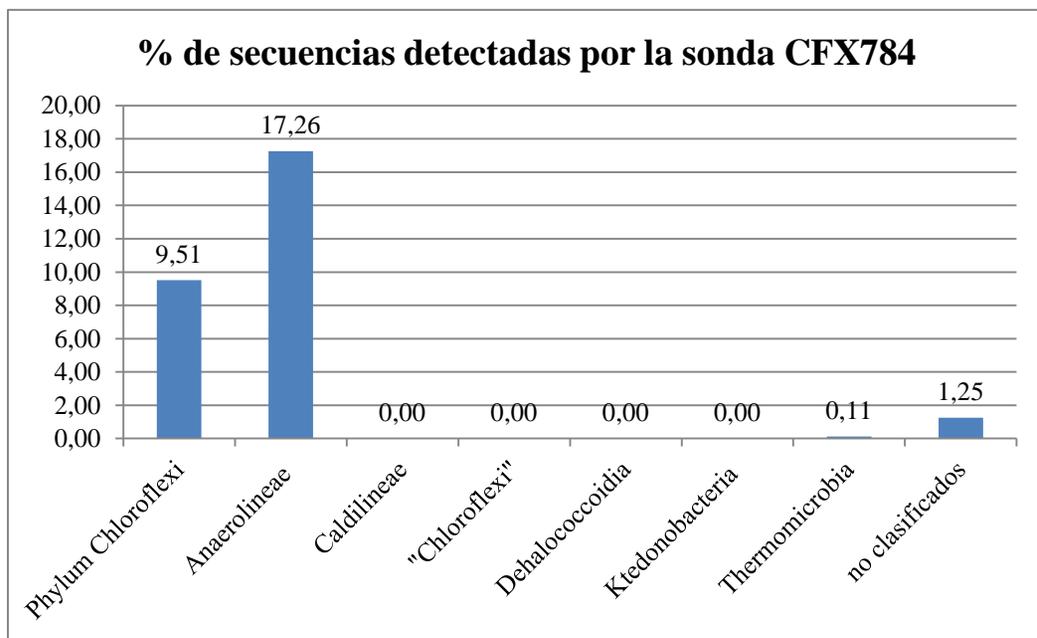


**Fig. 20b.** Porcentajes de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda **CFX1A311**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda CFX784

CFX784	Clase <i>Anaerolineae</i>	784-801	Sonda: 5' ACCGGGGTCTCTAATCCC 3' Blanco: 5' GGGATTAGAGACCCCGGT 3'
--------	---------------------------	---------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	2636371	3943	0,15
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	3516	9,51
<i>Anaerolineae</i>	19740	3408	17,26
<i>Caldilineae</i>	1094	0	0,00
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	0	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	0	0,00
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	0	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	885	1	0,11
no clasificados	8582	107	1,25

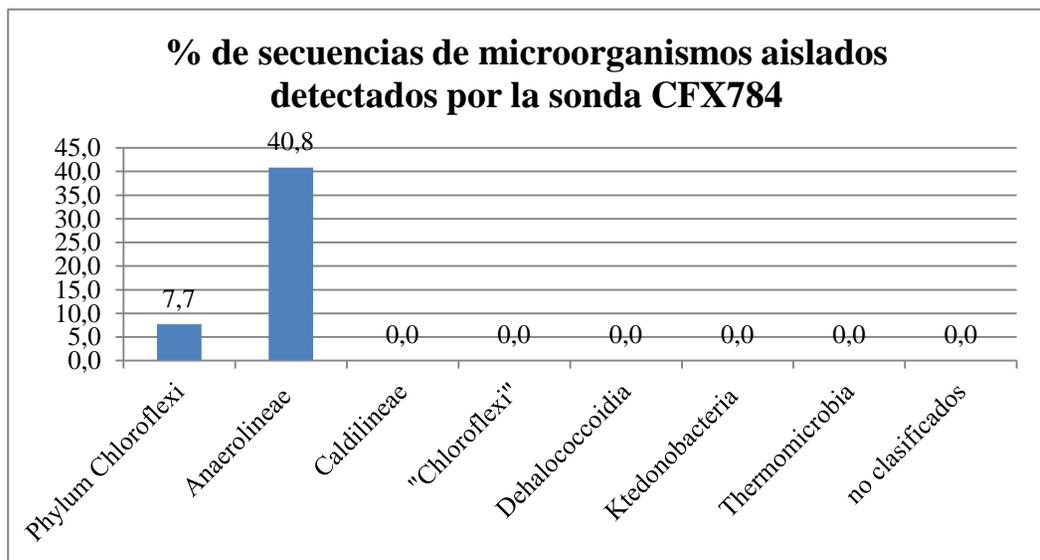


**Fig. 21a.** Porcentajes de secuencias de OFC aislados y no cultivados detectados por la sonda **CFX784**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda CFX784

CFX784	Clase <i>Anaerolineae</i>	784-801	Sonda: 5' ACCGGGGTCTCTAATCCC 3' Blanco: 5' GGGATTAGAGACCCCGGT 3'
--------	---------------------------	---------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	393954	20	0,005
Phylum <i>Chloroflexi</i>	259	20	7,7
<i>Anaerolineae</i>	49	20	40,8
<i>Caldilineae</i>	15	0	0,0
" <i>Chloroflexi</i> "	75	0	0,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	0	0,0
<i>Ktedonobacteria</i>	26	0	0,0
<i>Thermomicrobia</i>	24	0	0,0
no clasificados	29	0	0,0

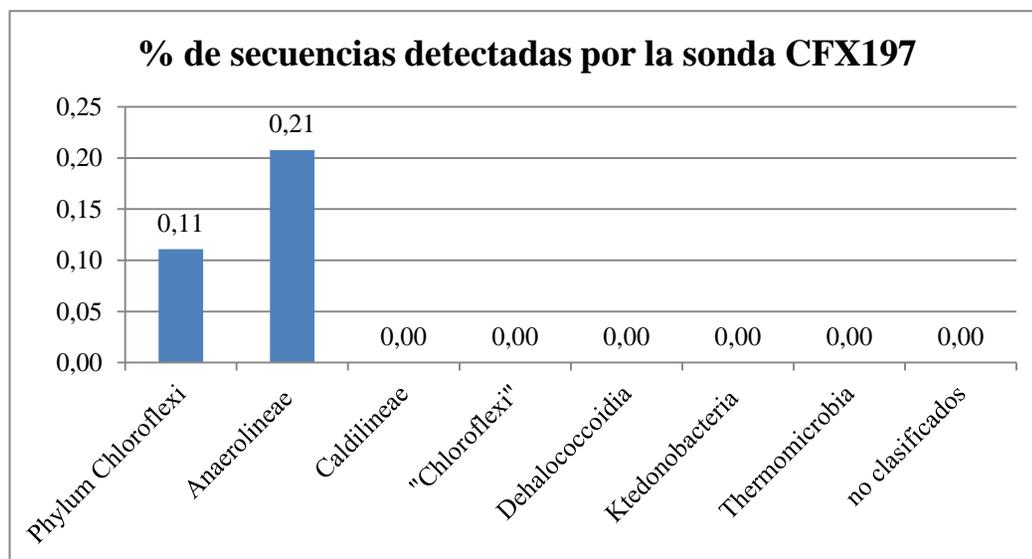


**Fig. 21b.** Porcentajes de secuencias de OFC aislados detectados por la sonda **CFX784**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda CFX197

CFX197	Filotipos no cultivados de la clase <i>Anaerolineae</i>	197-214	Sonda: 5' TCCCGGAGCGCCTGAACT 3' Blanco: 5' AGTTCAGGCGCTCCGGGA 3'
--------	---	---------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	2636371	49	0,002
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	41	0,11
<i>Anaerolineae</i>	19740	41	0,21
<i>Caldilineae</i>	1094	0	0,00
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	0	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	0	0,00
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	0	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	885	0	0,00
no clasificados	8582	0	0,00

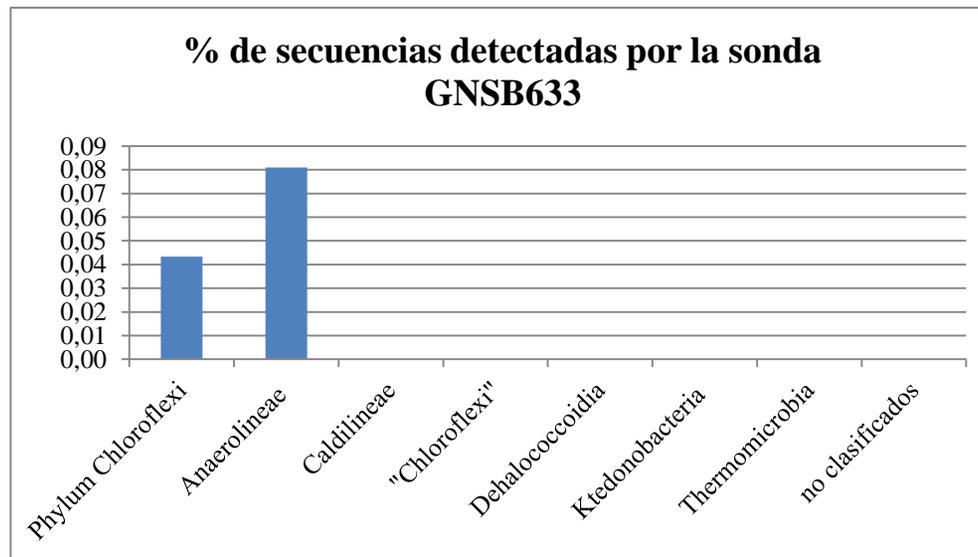


**Fig. 22.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados y no cultivados detectados por la sonda **CFX197**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda GNSB633

GNSB633	Clase <i>Anaerolineae</i>	633 - 652	Sonda: 5' TAGCCCGCCAGTCTTGAACG 3' Blanco: 5' CGTTCAAGACTGGCGGGCTA 3'
---------	---------------------------	-----------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	2636371	16	0,001
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	16	0,04
<i>Anaerolineae</i>	19740	16	0,08
<i>Caldilineae</i>	1094	0	0,00
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	0	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	0	0,00
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	0	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	885	0	0,00
no clasificados	8582	0	0,00

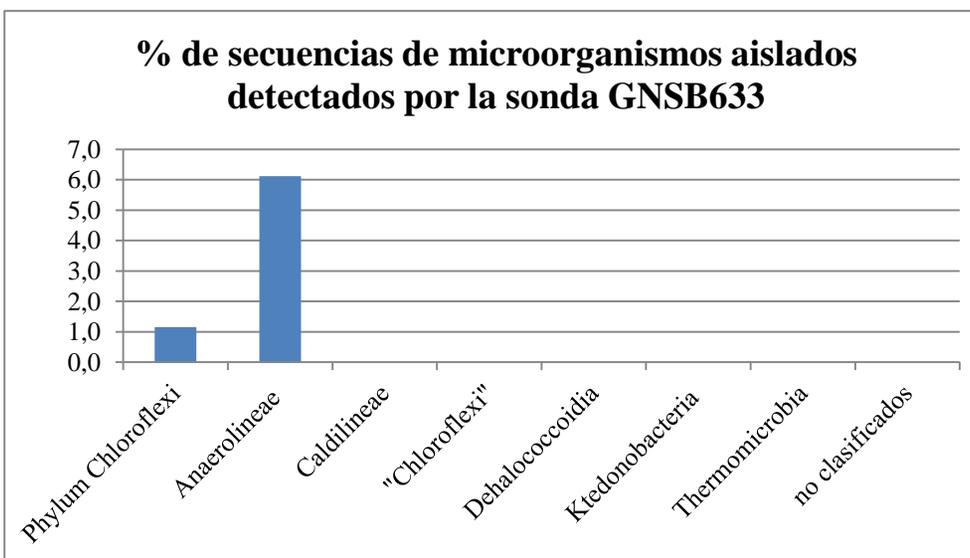


**Fig. 23a.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados y no cultivados detectados por la sonda **GNSB633**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda GNSB633

GNSB633	lase <i>Anaerolineae</i>	633 - 652	Sonda: 5' TAGCCCGCCAGTCTTGAACG 3' Blanco: 5' CGTTCAAGACTGGCGGGCTA 3'
---------	--------------------------	-----------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	393954	3	0,001
Phylum <i>Chloroflexi</i>	259	3	1,2
<i>Anaerolineae</i>	49	3	6,1
<i>Caldilineae</i>	15	0	0,0
"Chloroflexi"	75	0	0,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	0	0,0
<i>Ktedonobacteria</i>	26	0	0,0
<i>Thermomicrobia</i>	24	0	0,0
no clasificados	29	0	0,0



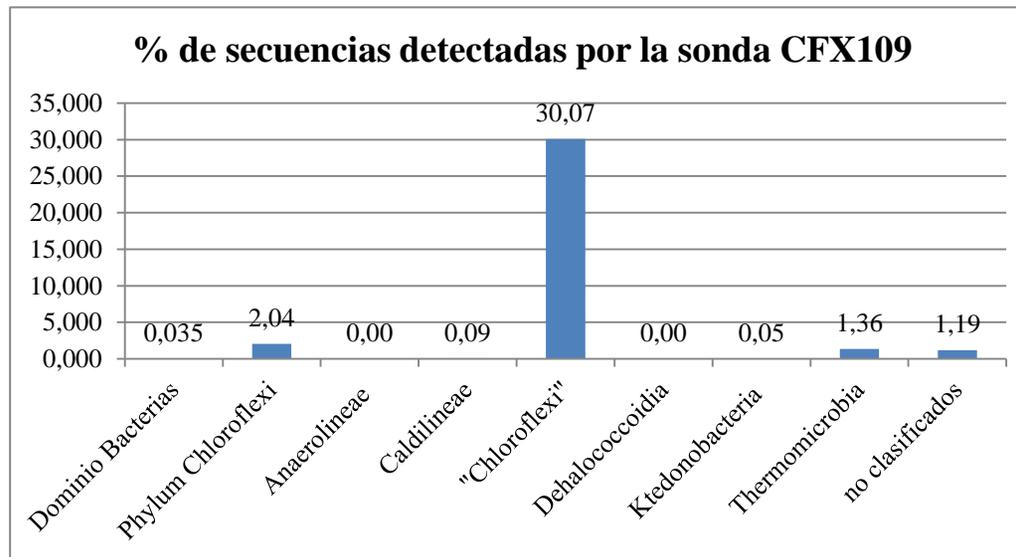
**Fig. 23b.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda **GNSB633**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda CFX109

CFX109	Clase " <i>Chloroflexi</i> "	109-126	Sonda: 5' CACGTGTTCTCAGCCGT 3' Blanco: 5' ACGGCTGAGGAACACGTG 3'
--------	------------------------------	---------	--

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	2636371	914	0,035
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	755	2,04
<i>Anaerolineae</i>	19740	0	0,00
<i>Caldilineae</i>	1094	1	0,09
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	639	30,07
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	0	0,00
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	1	0,05
<i>Thermomicrobia</i>	885	12	1,36
no clasificados	8582	102	1,19

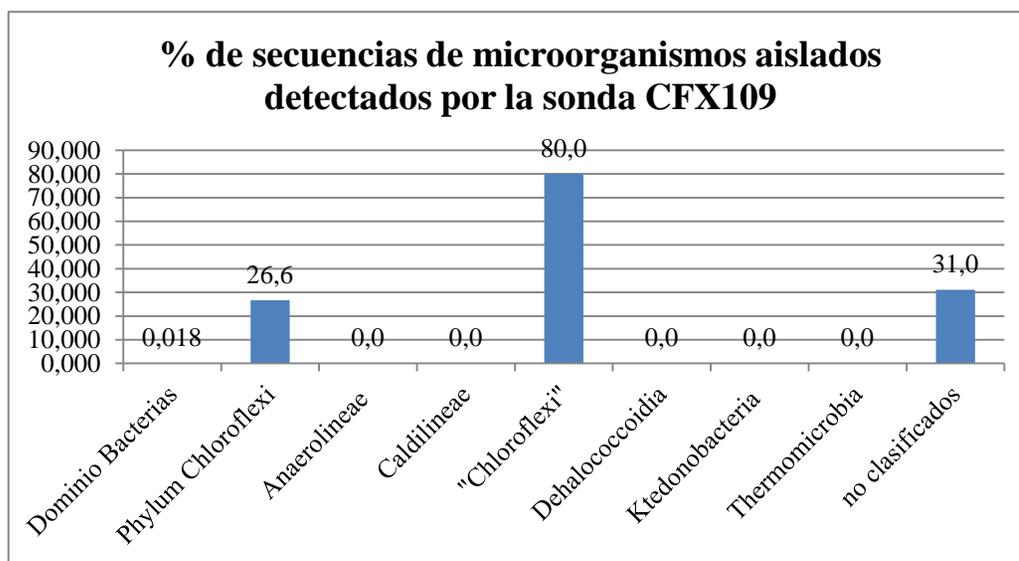
**Fig. 24a.** Porcentajes de secuencias de los OFC auslados y no cultivados detectados por la sonda **CFX109**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.



## Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda CFX109

CFX109	Clase " <i>Chloroflexi</i> "	109-126	Probe: 5' CACGTGTTTCCTCAGCCGT 3' Target: 5' ACGGCTGAGGAACACGTG 3'
--------	------------------------------	---------	--

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	393954	69	0,018
Phylum <i>Chloroflexi</i>	259	69	26,6
<i>Anaerolineae</i>	49	0	0,0
<i>Caldilineae</i>	15	0	0,0
" <i>Chloroflexi</i> "	75	60	80,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	0	0,0
<i>Ktedonobacteria</i>	26	0	0,0
<i>Thermomicrobia</i>	24	0	0,0
no clasificados	29	9	31,0

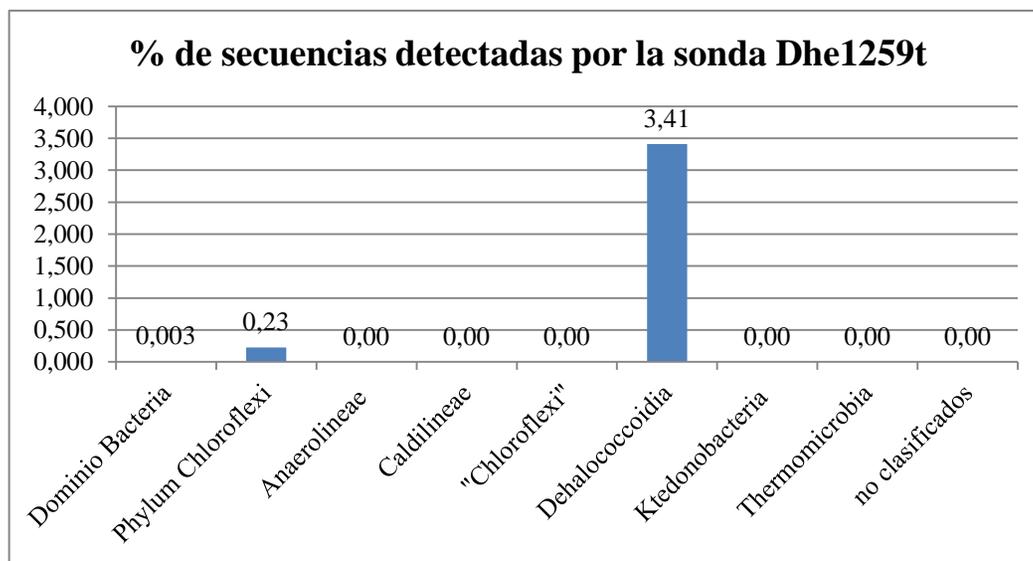


**Fig. 24b.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda **CFX109**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos detectados por la sonda Dhe1259t

Dhe1259t	Algunos <i>Dehalococcoides</i> spp.	1259–1278	Sonda: 5'AGCTCCAGTTCACACTGTTG 3' Blanco: 5'CAACAGTGTGAACTGGAGCT 3'
----------	-------------------------------------	-----------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacteria</i>	2636371	85	0,003
Phylum <i>Chloroflexi</i>	36959	84	0,23
<i>Anaerolineae</i>	19740	0	0,00
<i>Caldilineae</i>	1094	0	0,00
" <i>Chloroflexi</i> "	2125	0	0,00
<i>Dehalococcoidia</i>	2464	84	3,41
<i>Ktedonobacteria</i>	2069	0	0,00
<i>Thermomicrobia</i>	885	0	0,00
no clasificados	8582	0	0,00

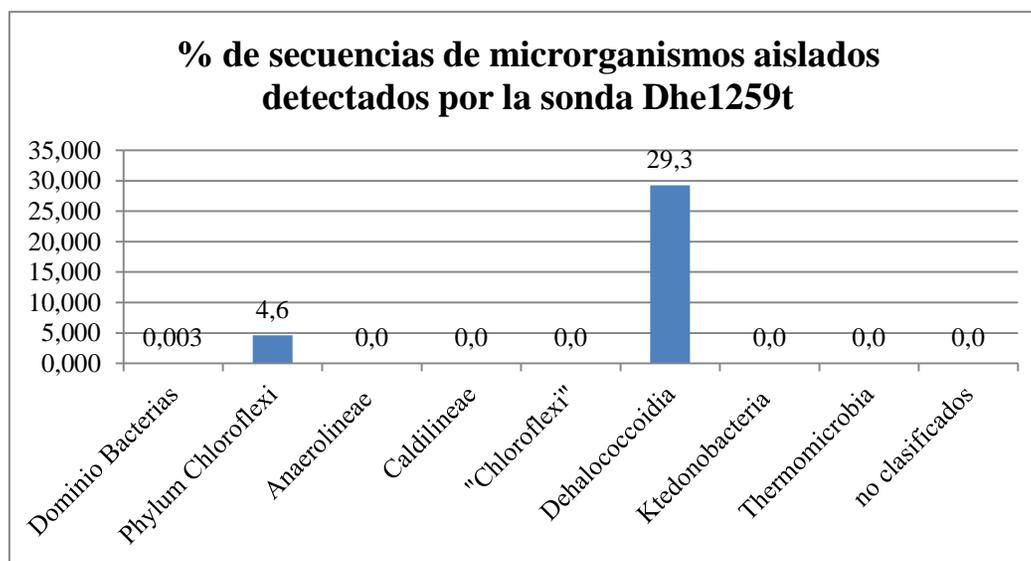


**Fig. 25a.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados y no cultivados detectados por la sonda **Dhe1259t**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## Secuencias de microorganismos aislados detectados por la sonda Dhe1259t

Dhe1259t	Algunos <i>Dehalococcoides</i> spp.	1259–1278	Sonda: 5' AGCTCCAGTTCACACTGTTG 3' Blanco: 5' CAACAGTGTGAACTGGAGCT 3'
----------	-------------------------------------	-----------	---

Microorganismos	Totales	Detectados	%
Dominio <i>Bacterias</i>	393954	12	0,003
Phylum <i>Chloroflexi</i>	259	12	4,6
<i>Anaerolineae</i>	49	0	0,0
<i>Caldilineae</i>	15	0	0,0
"Chloroflexi"	75	0	0,0
<i>Dehalococcoidia</i>	41	12	29,3
<i>Ktedonobacteria</i>	26	0	0,0
<i>Thermomicrobia</i>	24	0	0,0
no clasificados	29	0	0,0



**Fig. 25b.** Porcentajes de secuencias de los OFC aislados detectados por la sonda **Dhe1259t**. Se indica la clase para la que fue diseñada la sonda, la posición según *E. Coli*, la secuencia de la sonda, así como la de la secuencia blanco. Información obtenida de la base de datos ProbeBase.

## **Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN**

### **Protocolo de extracción de ADN con el kit UltraClean™, de MoBio Laboratories, inc.**

Recomendación: Usar guantes durante todo el procedimiento

1. Colocar 1mL de muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugar a 10000 x g durante 3 minutos.
2. Colocar el pellet en los tubos Bead Solution de 2 mL suministrados en el kit.
3. Mezclar en vortex.
4. Agregar 60 µL de la Solución S1 e invertir varias veces o mezclar en vortex.
5. Agregar 200 µl de la Solución IRS (Inhibitor Removal Solution)
6. Colocar los tubos Bead en posición horizontal sobre un vortex plano y asegurarlos con cinta adhesiva. Mezclar en vortex a máxima velocidad durante 10 minutos.
7. Centrifugar los tubos a 10000 x g durante 30 segundos.
8. Transferir el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5 mL (dependiendo de la muestra, se espera entre 400 a 450 µL de sobrenadante).
9. Agregar 250 µL de la Solución S2 y mezclar en vortex durante 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos a 10000 x g durante 1 minuto.
11. Descartar el pellet, transferir el sobrenadante a tubos Eppendorf de 2 mL.
12. Agregar 1,3 mL de la Solución S3 al sobrenadante (con cuidado de no desbordar) y mezclar en vortex.
13. Cargar aproximadamente 700 µL en las columnas con filtro y centrifugar a 10000 x g durante 1minuto. Descartar el líquido que traspasó la columna, agregar más sobrenadante a la columna y volver a centrifugar a 10000 x g durante 1minuto. Repetir hasta que todo el sobrenadante pase a través del filtro de la columna (se requiere un total de 3 veces por muestra).
14. Agregar 300 µL de la Solución S4 y centrifugar a 10000 x g durante 30 segundos.
15. Descartar el líquido que pasó por la columna.
16. Centrifugar de nuevo durante 1minuto.
17. Colocar cuidadosamente la columna en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Evitar trasladar la columna con restos de Solución S4

18. Agregar 30  $\mu\text{L}$  de agua miliQ en el centro de la membrana del filtro.
19. Centrifugar durante 30 segundos.
20. Descartar la columna. El ADN está listo para su utilización. De lo contrario, almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Nota:** Las microfotografías de la carátula corresponden; a una muestra de entrada al reactor tipo SBR de la curtiembre en estudio (arriba y a la izquierda) y de un enriquecimiento con extracto celular como sustrato y  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de  $e^-$  (abajo y a la derecha). Se utilizó la técnica de *FISH* con las sondas CFX1223 y GNSB941 del filo *Chloroflexi*. La gráfica de arriba y a la derecha corresponde a los % de organismos aislados y no cultivados detectados por la sonda del filo GNSB941 (datos obtenidos de la base datos ProbeBase). Abajo y a la izquierda fotografía de una corrida electroforética con diferentes perfiles de restricción (ARDRA) de secuencias de la placa N1.

