

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización de bacterias filamentosas en lodos  
activados para el tratamiento de aguas residuales  
industriales**

**Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica**

**Mariángeles García**

**Tutora: Dra. Ángela Cabezas**

**Cotutora: Lic. Patricia Bovio**

**Realizada en el Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de  
Bioquímica y Genómica Microbiana. Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero agradecer a Claudia Etchebehere por abrirme las puertas y permitirme llevar a cabo este proyecto, el cual valoro mucho y considero tan particular por todo el esfuerzo que implicó su inicio.

Quiero agradecer a mi tutora Ángela Cabezas por guiarme durante este trabajo y en particular por su dedicación, paciencia y entusiasmo. Agradecer a mi co-tutora Patricia Bovio por trabajar conmigo codo a codo, por sus consejos y su apoyo en todo momento. Y en particular por su gran compañerismo que hicieron para mi de este trayecto una experiencia muy linda. También agradecer a toda la gente del departamento de BIOGEM y a Andrés di Paolo por su apoyo durante el trabajo de microscopía.

Y especialmente quiero agradecer de corazón a mi familia por estar conmigo siempre y apoyarme de manera incondicional durante todo este proceso. A todos mis amigos por compartir mis alegrías y frustraciones, y a mis compañeros de estudio con los cuales pasamos horas entre libros para finalmente poder llegar hasta esta instancia.

Gracias a todos!

## RESUMEN

El proceso de lodos activados es utilizado para el tratamiento de efluentes por el cual se logra depurar aguas residuales, pero ocasionalmente estos sistemas se ven afectados a causa del crecimiento excesivo de bacterias filamentosas. Estas producen inconvenientes asociados al esponjamiento de los lodos conocido como *bulking*, lo que afecta negativamente las propiedades del lodo causando una baja sedimentabilidad y por lo tanto la pérdida de sólidos a través del efluente. Esto genera tanto inconvenientes operacionales como pérdidas económicas y contaminación ambiental. Las bacterias filamentosas pueden pertenecer a grupos taxonómicos diversos, entre ellos el filo *Chloroflexi*, al cual pertenecen varias filamentosas que han sido reportadas como causantes de bulking. La mayoría de las bacterias filamentosas no se han podido obtener en cultivo puro por lo cual no hay suficiente información disponible sobre su ecofisiología y sus requerimientos nutricionales. En nuestro país no se conoce cuáles son las causantes de problemas en lodos activados.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las bacterias filamentosas en tres sistemas de tratamiento de aguas residuales con lodos activados: Maltería (MO), Bebidas analcohólicas (BA) y de Residuos Hospitalarios (RH).

Las muestras fueron proporcionadas por el Estudio Pittamiglio (ingeniería hidráulica y ambiental) de los tres sistemas. Estas fueron analizadas por microscopía de contraste de fases e Hibridación in situ fluorescente (FISH) utilizando sondas dirigidas al filo *Chloroflexi*. También se realizó secuenciación masiva del gen de ARNr 16S y se analizaron las secuencias utilizando QIIME.

Los resultados mostraron que la morfología y abundancia de flóculos y de bacterias filamentosas fueron diferentes en las distintas muestras. Cada reactor presentó morfotipos característicos de bacterias filamentosas. Mediante FISH se detectó la presencia del filo *Chloroflexi* en las muestras de todos los reactores, pero la abundancia fue mayor en RH. Por otra parte, los resultados obtenidos por secuenciación masiva también muestran la presencia del filo *Chloroflexi* para los tres reactores pero señalan una mayor abundancia en RH. La estructura de

la población desarrollada en cada reactor fueron muy diferentes indicando una fuerte influencia del sustrato. Se detectaron varios grupos de bacterias filamentosas además de *Chloroflexi* como *Thiothrix unzi*, *Ca. Alysiosphaera europaea* y *Nostocoida limicola* l.

En conclusión, se logró caracterizar diferentes filamentosas en los tres reactores además del filo *Chloroflexi* por primera vez en industrias de nuestro país. La aplicación de técnicas moleculares como FISH y secuenciación masiva fueron herramientas indispensables para lograr su caracterización, aspecto fundamental para desarrollar medidas de control y/o evitar futuros problemas de sobrecrecimiento.

## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
1.1 Importancia del tratamiento de aguas residuales .....	6
1.2 Sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales.....	6
1.3 Lodos activados .....	10
1.3.1 Características principales de los Flóculos .....	12
1.3.2 Protozoarios relevantes en Lodos Activados .....	16
1.3.3 Bacterias filamentosas y problemas asociados a su sobrecrecimiento .....	18
1.3.4 Estrategias de control del bulking filamentoso.....	23
1.4 Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados en Uruguay .....	24
1.5 Bases de las técnicas de biología molecular Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) y Secuenciación masiva del gen de ARN 16S.....	25
1.5.1 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	25
1.5.2 Secuenciación masiva del gen de ARNr 16S .....	27
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
2.1. Observaciones macroscópicas de lodos .....	31
2.2 Observación microscópica de lodos .....	32
Principales características morfológicas.....	32
2.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	32
2.4 Secuenciación masiva.....	35
2.4.1 Extracción de ADN, amplificación y purificación.....	35
2.4.2 Secuenciación y Análisis bioinformático.....	36
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
Características macroscópicas.....	38
3.1 Microscopía óptica .....	38
3.2 Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	45
3.3 Secuenciación masiva del gen de ARNr 16S .....	50
3.4 Análisis filogenético.....	56
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
4.1 Diversidad de bacterias filamentosas en lodos activados alimentados con efluentes industriales en nuestro país .....	57
4.2 Problemas causados y control de las poblaciones de bacterias filamentosas detectadas	60
4.3 Rol de <i>Chloroflexi</i> en lodos activados .....	61
4.4 FISH como método de monitoreo de filamentosas en lodos activados.....	63
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>

<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
<u>7.1 Anexo 1. Color y sedimentación de las muestras.....</u>	<u>76</u>
<u>7.2 Anexo 2. Controles.....</u>	<u>78</u>
<u>7.3 Anexo 3. Extracción de ADN.....</u>	<u>79</u>
<u>7.4 Anexo 4. Amplificación por PCR.....</u>	<u>81</u>
<u>7.5 Anexo 5. Purificación de ADN.....</u>	<u>83</u>
<u>7.6 Anexo 6. Tinción Gram.....</u>	<u>84</u>
<u>7.7 Anexo 7. Imágenes microscopio óptico.....</u>	<u>91</u>
<u>7.8 Anexo 8. Hibridación in situ fluorescente (FISH).....</u>	<u>145</u>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia del tratamiento de aguas residuales

En las últimas décadas la industrialización y la población mundial han ido en creciente aumento, así como también la generación de aguas residuales. Se consideran aguas residuales a aquellas aguas que han sido utilizadas en la actividad doméstica o industrial y deben someterse a un tratamiento con la finalidad de reducir la concentración de contaminantes que afectan sus características (Orozco, 2005). La descarga de aguas residuales o efluentes industriales y domésticos inadecuadamente tratados o sin tratamiento han acelerado la degradación de muchos ecosistemas. La principal causa de contaminación de ríos y océanos es el vertido de aguas residuales no tratadas, los cuales pueden contener altos niveles de contaminantes (Ng, 2006). Además, no solo contribuyen con la contaminación de cuerpos de aguas receptoras, sino que también pueden afectar suelos y aguas subterráneas. Estos vertidos son de composición variable y pueden llegar a ser peligrosos o potencialmente tóxicos, por lo cual requieren un proceso de manipulación y tratamiento (Chen *et al.*, 2017; Ukah *et al.*, 2018).

En la actualidad, no se ha logrado establecer un equilibrio entre el progreso industrial y la sustentabilidad ambiental, circunstancia en la cual también intervienen aspectos sociales y económicos. La adecuada utilización de los sistemas de tratamiento de aguas residuales son de vital importancia, ya que contribuyen a proteger y aumentar la disponibilidad de agua dulce. A través de su descontaminación y reutilización, promueven la disminución de su demanda y el impacto ambiental que implica (Sperling, 2007).

## 1.2 Sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales

El agua es un recurso que se utiliza ampliamente en los procesos industriales y como resultado inevitablemente se generan aguas residuales. De acuerdo al tipo de industria y sus procesos las características de las aguas residuales que generan difieren en su composición, resistencia, flujo y volumen. Su composición

puede consistir altos niveles de materia orgánica y nutrientes, así como también sustancias no biodegradables o compuestos tóxicos (Patwardhan, 2017). El tratamiento a aplicar al agua residual depende tanto de su composición como de las normativas de su descarga.

Los procesos convencionales de tratamientos de aguas residuales emplean un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos con el fin de remover sólidos, materia orgánica e incluso nitrógeno (N) y fósforo (P). Estos procesos se clasifican de la siguiente manera: pretratamiento, y tratamiento primario, secundario y terciario (**Figura 1**) (Sonune y Ghate, 2004).



**Figura 1.** Esquema general de sistemas de tratamientos de aguas residuales. Los cuadros superiores indican el nombre, luego el proceso que ocurre en cada paso, en los de abajo se describe el mecanismo por el cual se realiza el tratamiento correspondiente a cada etapa. Figura modificada de Sonune, A. y Ghate, R. (2004).

El pretratamiento es opcional y es utilizado principalmente para eliminar materiales flotantes y partículas inorgánicas, con el fin de evitar problemas operativos en las siguientes etapas (Christian, 2006). La depuración de aguas residuales comienza con un tratamiento primario para la eliminación de sólidos en suspensión y materiales flotantes, mediante la implementación de un sedimentador. Durante el proceso de decantación, las partículas más densas que el agua logran asentarse en el fondo del sedimentador. En esta etapa

pueden añadirse o no coagulantes para optimizar el proceso de decantación (Tillman, 1991).

Seguido del primario, el tratamiento secundario es un proceso de gran importancia debido a que se produce la remoción de la materia orgánica disuelta. La biodegradación de materia orgánica es el proceso más utilizado en esta etapa, mientras que la oxidación química es menos frecuente por motivos económicos. La biodegradación puede ser aerobia o anaerobia, dependiendo de los requerimientos del tratamiento. Los sistemas aeróbicos funcionan en presencia de aire (oxígeno,  $O_2$ ), donde la materia orgánica soluble es convertida en dióxido de carbono ( $CO_2$ ), biomasa y agua a través de la actividad de bacterias heterótrofas (Grady, 2011). En cambio, los sistemas anaeróbicos convierten la materia orgánica en metano ( $CH_4$ ),  $CO_2$  y agua a través de una serie de reacciones que involucran hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis en ausencia de oxígeno. El biogás generado como producto constituido esencialmente por  $CO_2$  y  $CH_4$ , puede ser aprovechado como fuente de energía (Chan *et al.*, 2009; Ranade y Bhandari, 2014). Ambos tipos de biodegradación poseen una alta eficacia de remoción orgánica pero los sistemas aerobios son capaces de obtener una mejor calidad del efluente en comparación con sistemas anaerobios (Chan *et al.*, 2009). Por otra parte, estos últimos pueden trabajar con altas cargas orgánicas mientras que los sistemas aeróbicos son más adecuados para trabajar con baja carga orgánica. Los sistemas anaerobios requieren menor suministro de energía en comparación con los aerobios (suministro de aire al reactor) y además contribuyen con la recuperación y utilización de recursos a través de la obtención de bioenergía potencial obtenida en el proceso. Sin embargo, suelen generar malos olores y no se adaptan fácilmente a los cambios en parámetros tales como temperatura, pH y carga orgánica (Chan *et al.*, 2009).

El tratamiento terciario también conocido como tratamiento avanzado, es un proceso utilizado con el fin de mejorar la calidad del efluente luego del tratamiento secundario. Algunos tipos de tratamiento terciario son: adsorción en carbono activo, ósmosis inversa, intercambio iónico, electrodiálisis, oxidación

química (cloración y ozonación), o eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) entre otros (Ramalho, 1990).

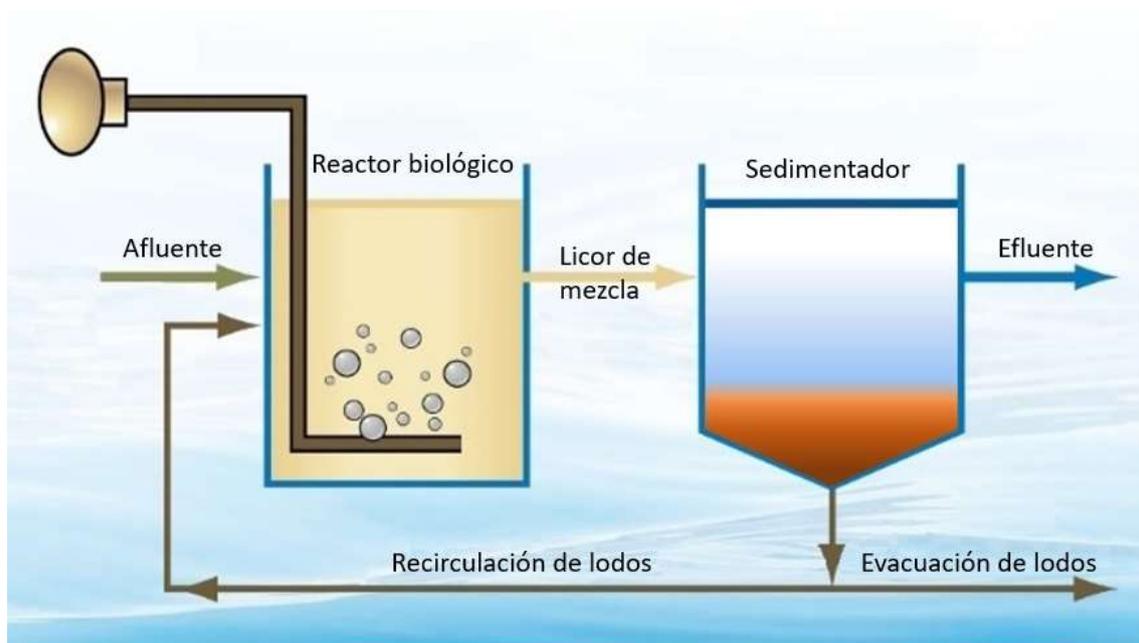
La implementación de un tratamiento terciario depende de la calidad final deseada del efluente. En nuestro país existen normas para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas. Los efluentes deben cumplir con los valores establecidos según las normas para ser vertidos. El Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) determina los parámetros que deben cumplir los efluentes y también se encarga de la aplicación de las normativas establecidas. El artículo 11 del decreto 253/79 establece los parámetros que debe cumplir un efluente para poder ser vertido en un curso de agua (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Valores límite que debe cumplir un efluente para poder ser vertido en un cuerpo de agua. Tomado de la página web de MVOTMA ([www.mvotma.gub.uy](http://www.mvotma.gub.uy)).

Parámetro	Estandar
Material flotante	Ausente
Temperatura	Máx 30°C, pero no podrá elevar la temperatura del cuerpo receptor más de 2°C
pH	Entre 6,0 y 9,0
DBO <sub>5</sub>	Máx 60 mg/L
Sólidos suspendidos totales	Máx 150 mg/L
Aceites y grasas	Máx 50 mg/L
Sulfuros	Máx 1 mg/L
Detergentes	Máx 4 mg/L en LAS
Sustancias fenólicas	Máx 0,5 mg/L en C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
Caudal	El caudal máximo en cualquier instante no podrá exceder al caudal medio del período de actividad
Amoniaco	Máx 5 mg/L en N
Fósforo total	Máx 5 mg/L en P
Coliformes fecales	Máx 5000 CF 100 ml
Cianuro	Máx 1 mg/L
Arsénico	Máx 0,5 mg/L
Cadmio	Máx 0,05 mg/L
Cobre	Máx 1 mg/L
Cromo	Máx 1 mg/L
Mercurio	Máx 0,005 mg/L
Niquel	Máx 2 mg/L
Plomo	Máx 0,3 mg/L
Zinc	Máx 0,3 mg/L

### 1.3 Lodos activados

El proceso de lodos activados es un sistema biológico ampliamente utilizado para depurar aguas residuales en todo el mundo, tanto de origen municipal como industrial. Tiene como objetivo remover los contaminantes presentes en el agua residual con el fin de obtener agua apta para otros usos o bien para evitar daños al ambiente luego de su descarga (Tandoi *et al.*, 2017). La configuración general de un sistema de lodos activados consiste primeramente en una etapa bioquímica que se produce en un tanque con aireación (reactor) y luego una etapa física en un sedimentador secundario o también llamado clarificador (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema general de sistema de lodos activados. Adaptado de la presentación Tratamiento Biológico de Aguas Residuales sin generación de Lodos sistema MSABP™. Julio Elias Grau Arequipa, Septiembre, 2011 (Acuarius Technologies, INC).

El sistema comienza con la entrada del afluente al reactor biológico con aireación, sitio donde se produce la degradación de la materia orgánica y el crecimiento de biomasa. Del reactor biológico, el agua pasa ya tratado al sedimentador donde se produce la decantación de la biomasa para obtener el efluente clarificado (Tansel, 2018). Una cierta cantidad de la biomasa sedimentada es recirculada hacia el reactor, ya que funciona como inóculo. Regulando la recirculación se mantiene una concentración adecuada de

biomasa en el reactor biológico. La biomasa que queda en exceso, también conocida como lodo secundario o lodo biológico, es extraída del sistema y debe ser procesada para su correcta disposición final. El tratamiento de lodos biológicos incorpora procesos como espesamiento y deshidratación para eliminar el agua y disminuir su volumen, con el objetivo de facilitar su transporte. El secado también disminuye la cantidad de patógenos además de reducir el peso del lodo mediante la evaporación del agua y como última etapa se puede realizar la desinfección. Por otra parte, la estabilización química de los lodos puede realizarse a través de digestión anaeróbica, digestión aeróbica, esterilización química o térmica. Esta permite reducir los sólidos suspendidos hasta en un 30%, disminuye la presencia de patógenos y olores desagradables. (Amador *et al.*, 2015; Hreiz *et al.*, 2015).

La etapa esencial del proceso de depuración en los sistemas de lodos activados se produce en el reactor biológico. En esta etapa la oxidación de la materia orgánica se realiza mediante un cultivo suspendido de microorganismos. Las bacterias son las responsables de la biodegradación y utilizan el oxígeno disuelto proporcionado por la aireación para transformar la materia orgánica en biomasa y CO<sub>2</sub>. Además de bacterias, las cuales comprenden el 95 % de la biomasa, también se encuentran otros microorganismos tales como virus, hongos, protozoos y algunos metazoos (Martins *et al.*, 2004; Erijman *et al.*, 2011).

Existen parámetros que se determinan para monitorear el funcionamiento del reactor biológico los cuales deben encontrarse dentro de determinados rangos para asegurar un tratamiento biológico óptimo. Los parámetros más importantes se encuentran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Los principales parámetros operacionales que se utilizan para controlar los sistemas de lodos activados. Elaborada en base al artículo Activated Sludge Treatment Process - Concept and System Design. Bhargava A. 2016.

Principales parámetros de control en Lodos Activados	
Parámetros	Descripción
DBO (mg/L)	Demanda bioquímica de oxígeno
F/M (mg/L)	Relación alimento/microorganismos
MLSS (mg/l)	Sólidos suspendidos del licor de mezcla
MLVSS (mg/L)	Sólidos suspendidos volátiles del licor de mezcla
OD	Oxígeno disuelto
pH	-
SRT	Tiempo de retención de sólidos
SST mg/L	Sólidos sedimentables totales
SVI (ml/g)	Índice de volumen del lodo
Edad del lodo	-

El SVI y los SST son muy utilizados para caracterizar la eficiencia de la sedimentación del lodo ya que se encuentran muy relacionados con el proceso de biofloculación (Dierdonck *et al.*, 2012).

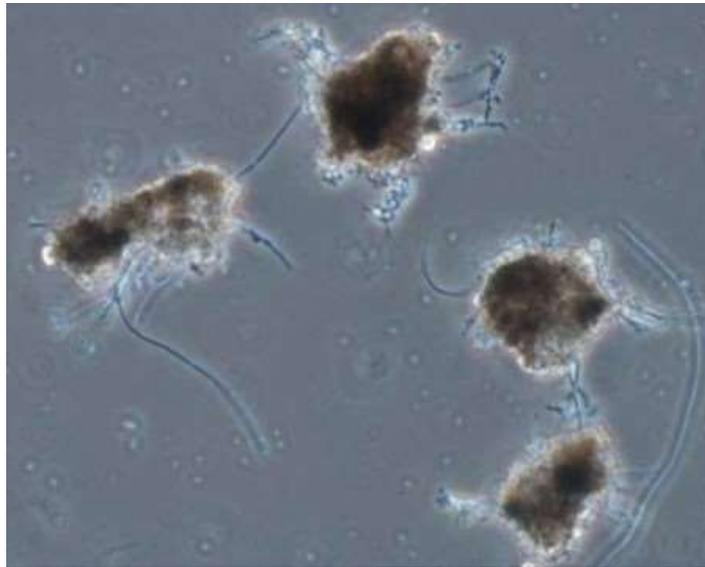
Las células bacterianas no agrupadas se comportan como sólidos coloidales y no son capaces de sedimentar por sí solas en el clarificador. Para poder lograrlo deben generar una biomasa floculenta capaz de decantar y compactarse en el fondo del clarificador. Este proceso es conocido como floculación (formación de flóculos) el cual es fundamental para una adecuada sedimentación y compactación del lodo.

### 1.3.1 Características principales de los Flóculos

#### ***Formación y composición***

Los flóculos están constituidos por un conglomerado de microorganismos que incluyen bacterias filamentosas, partículas orgánicas e inorgánicas y excreciones metabólicas (**Figura 3**). Este cúmulo logra mantenerse unido gracias a una matriz polimérica que rodea las células y a enlaces químicos los cuales involucran iones divalentes como el  $Ca^{2+}$ . Alrededor del flóculo como también en espacios interfloculares, pueden encontrarse bacterias libres,

protozoos y algunos metazoos. Idealmente los flóculos deben ser densos y compactos, con forma redonda y definida, ya que estas características contribuyen a una buena sedimentabilidad del lodo (Eikelboom, 2000).



**Figura 3.** Imagen microscópica de las estructuras floculares de una muestra de lodos activados. Aumento 1000X. Forma «ideal» de flóculos captadas por contraste de fases. Tomado del “Curso de microbiología de lodos activados”, Grupo de Bioindicación de Sevilla (GBS).

Estas estructuras floculares representan la unidad funcional y estructural del proceso de purificación de los sistemas de lodos activados. Su formación se produce mayoritariamente gracias a bacterias formadoras de flóculos, siendo *Zoogloea ramigera* la principal. Esta bacteria es capaz de sintetizar una sustancia mucilaginosa que facilita la adhesión de las células bacterianas con las partículas (Eikelboom, 2000; Aonofriesei *et al.*, 2007). Este mucílago es una sustancia polimérica extracelular (SPE), capaz de formar una matriz tridimensional la cual es originada principalmente por lisado celular, componentes exocelulares y materia orgánica adsorbida. La formación, estructura, y estabilidad de los flóculos dependen de la presencia de los SPE, los cuales también intervienen en las características hidrófobas/hidrofílicas del lodo, la sedimentabilidad y en su deshidratación (Yuan and Wang, 2013; Chen *et al.*, 2017). Cuando la proliferación de *Z. ramigera* es excesiva, provoca un fenómeno llamado «bulking viscoso» a causa de la abundante producción de SPE (Salehizadeh y Shojaosadati, 2001; Sponza, 2003).

Un componente fundamental que forma parte de los flóculos son las bacterias filamentosas, las cuales son de gran importancia estructural ya que brindan un «esqueleto» que proporciona resistencia y evita la disgregación del flóculo ante esfuerzos mecánicos tales como aireación o agitación (Martins *et al.*, 2004). Si la cantidad de bacterias filamentosas presentes no es suficiente, los flóculos se vuelven débiles y tienden a romperse causando la aparición de microflóculos que luego escapan con el efluente. Por el contrario, si la cantidad de filamentosas es excesiva, se produce un aumento en la superficie flocular disminuyendo su densidad y por lo tanto, su capacidad para decantar. Por estas razones, los flóculos requieren la presencia de una determinada concentración de SPE y determinada cantidad de bacterias filamentosas en su interior.

### ***Morfologías floculares***

Los flóculos pueden exhibir diferentes estructuras morfológicas las cuales se logran distinguir a través de la observación al microscopio óptico. En la **Tabla 3** se muestran las principales características morfológicas que pueden presentar los flóculos.

**Tabla 3.** Principales características morfológicas de los flóculos. Adaptado del “Curso de microbiología de lodos activados”, GBS.

Características morfológicas	
Forma	Regular Irregular
Tamaño	Pequeños (<25 µm) Medianos (25-250 µm) Grandes (>250 µm)
Estructura	Compacta Abierta
Textura	Fuerte Débil

La forma de los flóculos puede ser esférica, alargada o estrellada pero se clasifican en estructuras regulares o irregulares. Se considera que es regular si posee forma redondeada y uniforme, que es la forma “ideal”, pero es poco común encontrarla ya que en los sistemas predominan las formas irregulares. El tamaño de los flóculos varía considerablemente, los de mayor tamaño son capaces de sedimentar más rápidamente que los menores (Eikelboom, 2000; Grady, 1999). Otra característica de los flóculos es su densidad, propiedad determinada por la estructura del flóculo la cual puede ser compacta o abierta. Las estructuras compactas se caracterizan por no presentar huecos en el interior del flóculo mientras que las estructuras abiertas presentan aspecto algodonoso con varios huecos en el interior. Las estructuras más compactas poseen la capacidad de sedimentar más rápido (Eikelboom, 2000). Además del tamaño, forma y densidad, también se considera la resistencia de los flóculos. Esta propiedad consiste en el grado de cohesión entre las partículas y puede clasificarse como fuerte o débil. La resistencia de los flóculos no es una característica independiente, sino que está relacionada con la estructura; las más densas suelen ser más fuertes y por lo tanto más resistentes ante la ruptura en comparación con estructuras menos compactas (Hermawan *et al.*, 2004).

Además de la observación de estas características, también se puede caracterizar la abundancia de bacterias filamentosas (**Figura 4**).

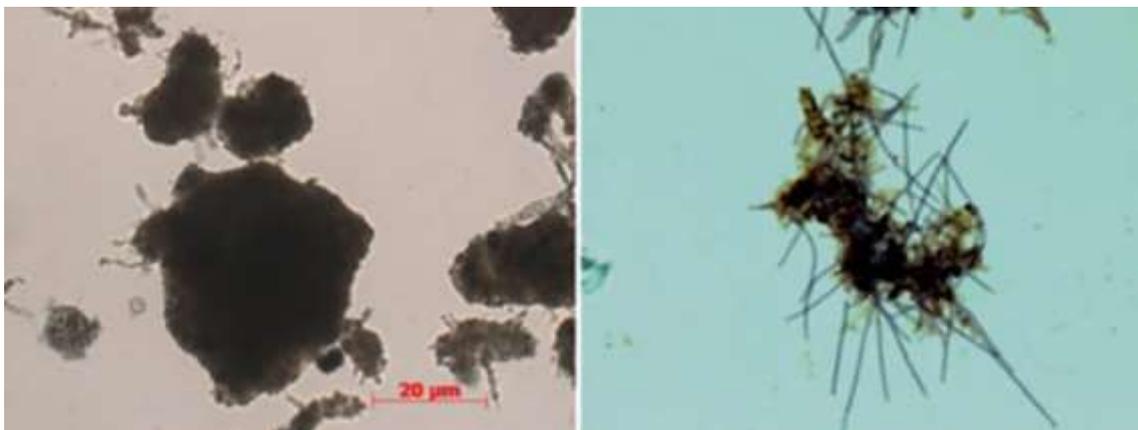


Figura 4. Estructuras floculares en lodos activados. Izquierda: flóculos redondos y compactos (contraste de fases 400X). Derecha: flóculo con bacterias filamentosas (iluminación directa 1000X). Imagen adaptada de Tandoi *et al.*, 2017.

Si el sobrecrecimiento de estos organismos se extiende hacia el espacio interflocular se pueden generar problemas en la sedimentación del lodo (Tandoi *et al.*, 2005). Es por eso que se han desarrollado algunos métodos para cuantificar la cantidad de filamentos, uno de ellos es el de valoración subjetiva de la abundancia filamentosa. Fue desarrollado por Jenkins *et al.*, 1993 y es simple y rápido de aplicar. La abundancia se clasifica de acuerdo a una escala que se muestra en la **Tabla 4**.

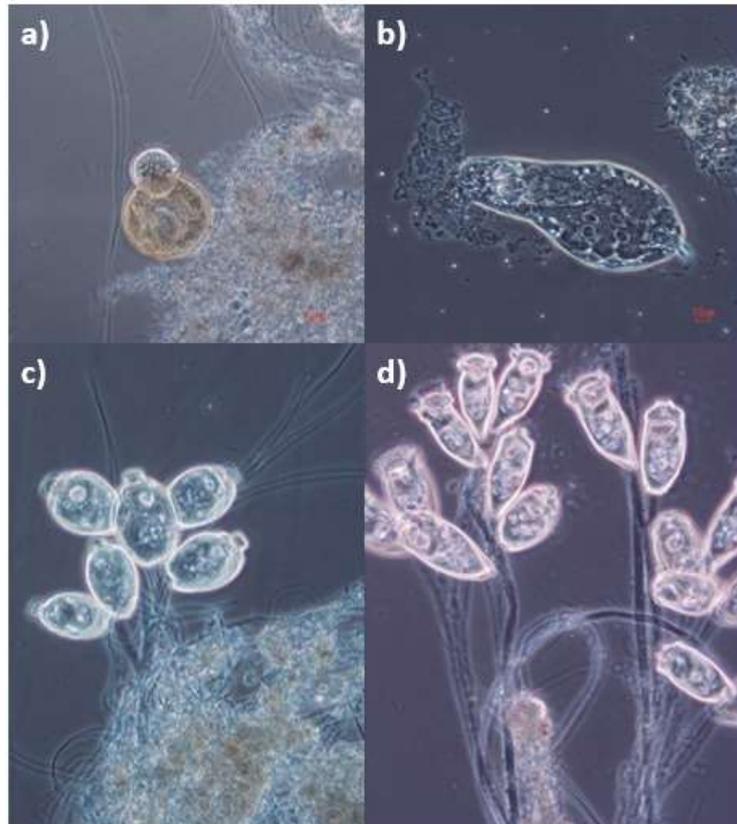
**Tabla 4.** Puntuación subjetiva de la abundancia de bacterias filamentosas de acuerdo a Jenkins *et al.*, 1993.

Abundancia filamentosa relativa		
Valor numérico	Abundancia	Descripción de imagen microscópica
0	Ninguna	
1	Poca	Presencia de filamentos, pero solo se observan en un flóculo ocasional
2	Algunas	Filamentos comúnmente observados, pero no presentes en todos los flóculos
3	Comunes	Filamentos observados en todos los flóculos, pero a baja densidad. 1 - 5 filamentos por flóculo
4	Muy comunes	Filamentos observados en todos los flóculos a densidad media. >5 - 20 filamentos por flóculo
5	Abundantes	Filamentos observados en todos los flóculos a alta densidad. > a 20 filamentos por flóculo
6	Excesivas	Filamentos presentes en todos los flóculos: aparecen más filamentos que flóculos o filamentos que crecen en gran abundancia en solución

### 1.3.2 Protozoarios relevantes en Lodos Activados

Además de las bacterias, los protozoos son microorganismos de gran importancia en la comunidad microbiana de los lodos activados. Algunos de ellos se encuentran asociados a los flóculos y constituyen aproximadamente el 5% del peso seco de la biomasa. Su presencia es fundamental para la reutilización de nutrientes ya que poseen vida corta debido a su alto metabolismo. Estos microorganismos constituyen las cadenas tróficas del ecosistema que se genera en el reactor, las cuales se desarrollan por una parte en función de las características del influente tales como los nutrientes, la demanda química de oxígeno (DQO) y DBO, y por otra parte en función de las condiciones

operacionales y ambientales. Los protozoos se pueden encontrar tanto en los flóculos como en el espacio interflocular. En el espacio interflocular se encuentran los ciliados nadadores, flagelados y amebas, mientras que asociados a los flóculos se encuentran los ciliados sésiles y reptantes (**Figura 5**).

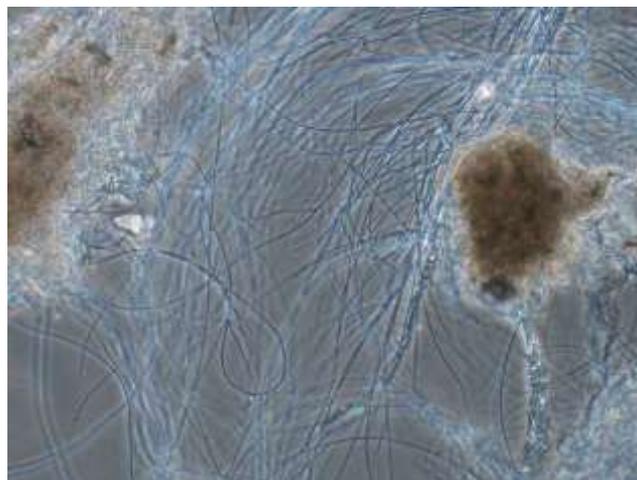


**Figura 5.** Protozoos presentes en lodos activados por microscopía de contraste de fases: a) Ameba. Arcella (400X), b) Rotífero (400X), c) y d) Ciliados, Epistylis sp. (400X). Imágenes tomadas de Microbiología de lodos activados (Yamilet Arcos 2013).

Los reptantes se alimentan de las bacterias que se encuentran en la superficie flocular, contribuyendo a la oxigenación de zonas interiores del flóculo a través de su desplazamiento. Por otra parte, los ciliados sésiles se alimentan de bacterias libres dispersas y ayudan a dar consistencia a los flóculos, lo que mejora su capacidad para sedimentar (Curds *et al.*, 1973; Madoni *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Bacterias filamentosas y problemas asociados a su sobrecrecimiento

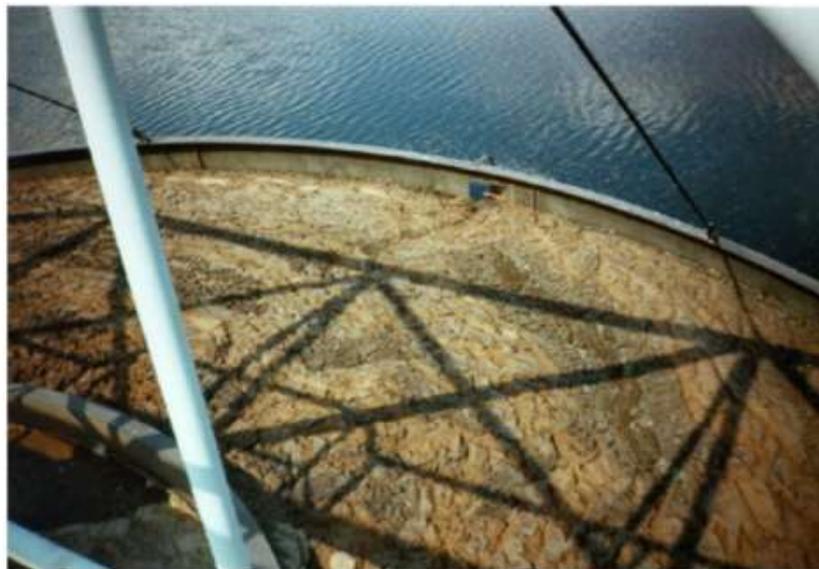
Los sistemas de lodos activados sufren ocasionalmente hinchamiento de lodos, fenómeno conocido como «bulking» y de formación de espumas, conocido como «bulking». Ambos fenómenos generan graves problemas operacionales en los sistemas de tratamiento, y son causados principalmente por un excesivo crecimiento de bacterias filamentosas. El bulking afecta la sedimentabilidad del lodo, el cual se vuelve más ligero y sufre un aumento del volumen. Esto impide una adecuada sedimentación y por lo tanto, genera la pérdida de sólidos sedimentables a la salida del decantador en el efluente y una disminución de la biomasa en el reactor biológico (Eikelboom, 2000; Tandoi, 2017). La proliferación genera estructuras floculares abiertas y difusas, y también forman redes mediante puentes interfoculares. Como consecuencia se produce el hinchamiento del lodo y la retención de agua en el lodo sedimentado, lo que afecta su decantabilidad y sus propiedades de deshidratación (Burger *et al.*, 2017). Los organismos filamentosos que proliferan en el reactor, particularmente aquellos que se extienden desde los flóculos así como también los que se encuentran libres, son esencialmente los responsables de los problemas de sedimentación del lodo y su compactación (Burger *et al.*, 2017). En la **Figura 6** se muestra un ejemplo de dicho caso, donde se puede apreciar el sobrecrecimiento de bacterias filamentosas.



**Figura 6.** Sobrecrecimiento de bacterias filamentosas en muestra de lodos ativados. Tomado del “Curso de microbiología de lodos activados”, GBS.

Por otra parte, el sobrecrecimiento de algunos organismos filamentosos genera la formación de espuma en la superficie del reactor y algunas veces en el sedimentador. Es un problema que afecta a muchos sistemas de lodos activados en todo el mundo, provoca un aumento en los costos operativos y una disminución en la calidad del efluente. Interfiere en el funcionamiento del sistema de tratamiento y dificulta el control de los parámetros operativos, entre otros inconvenientes. (Soddell y Seviour, 1990; Cubbage *et al.*, 2017).

En la **Figura 7** se puede apreciar la formación de espuma en la superficie de un clarificador.



**Figura 7.** Presencia de espuma en la superficie de un clarificador causada por filamentosas, grasas y materiales flotantes. Imagen tomada de Tandoi *et al.*, 2017.

Muchas de las bacterias filamentosas responsables de la formación de espumas poseen una superficie hidrófoba. La espuma se genera debido a que se establece un sistema trifásico en el reactor, compuesto por burbujas de aire, sustancias surfactantes y partículas hidrofóbicas (superficie bacteriana). Estos organismos logran flotar en la superficie y son capaces de producir materiales extracelulares como lípidos, lipopéptidos, proteínas y carbohidratos los cuales poseen propiedades surfactantes, lo que facilita la generación de espuma (Madoni *et al.*, 2000; Griffiths y Stratton, 2010).

En 1975, en busca de una solución general para los problemas generados por bulking y foaming, Eikelboom desarrolló una clave de identificación para caracterizar bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados, basados en características morfológicas y pruebas de tinción microscópicas. A partir de dicho trabajo se publicaron manuales con la descripción y caracterización de 25 bacterias filamentosas diferentes presentes regularmente en sistemas de lodos activados (Eikelboom, 1975). En la **Tabla 5** se muestran siete grupos de bacterias filamentosas según el sistema de Eikelboom.

**Tabla 5.** Clasificación de morfotipos de bacterias filamentosas caracterizadas por Eikelboom. Adaptado de Eikelboom, 1975.

Bacterias filamentosas - Morfotipos Eikelboom							
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
Grupos	Formación de vaina, bacterias Gram negativas	Formación de vaina, bacterias Gram positivas	Sin vainas, rizadas, bacterias multicelulares similares a algas	Bacterias delgadas enrolladas	Rectas, multicelulares Gram negativas	Bacterias filamentosas móviles	Tipos adicionales
Morfotipos	<i>Sphaerotilus natans</i>	Tipo 0041	<i>Nostocoida limicola</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	Tipo 0803	<i>Beggiatoa</i>	<i>Nocardia</i> sp
	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Tipo 0675	Cyanophyceae	Tipo 0581	Tipo 1091	Tipo 0914	Fungi
	Tipo 1701	Tipo 1851	Tipo 021N	Tipo 0192	Tipo 0092	Tipo 1111	Tipo 1863
	Tipo 1702				Tipo 0961	Tipo 1501	Tipo 0411
	Tipo 0321						

Los morfotipos con numeración corresponden a organismos filamentosos observados a partir de muestras de lodos activados, pero de los cuales en ese entonces no se disponía de cultivos puros. En la actualidad muchas de esas bacterias han sido identificadas filogenéticamente, algunas a partir de cultivos puros o utilizando hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Sin embargo, aún se sigue utilizando la nomenclatura con números establecida por Eikelboom.

A través de los años se han encontrado más de 30 morfotipos diferentes de bacterias filamentosas procedentes de plantas de tratamiento de aguas municipales, y 40 morfotipos más provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales. No obstante, sólo unas pocas especies de filamentosas se encuentran involucradas en los fenómenos de bulking y foaming (Kragelund *et al.*, 2011). Estos organismos pertenecen a los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Chloroflexi*. Las filamentosas que frecuentemente generan bulking son *Nostocoida* perteneciente a

*Alphaproteobacteria*, candidatus *Microthrix* y *Micolata* pertenecientes a *Actinobacteria*, *Thiothrix* y tipo 021N pertenecientes a *Gammaproteobacteria* y tipo 1851, tipo 0041 y 0092 del filo *Chloroflexi* (Nielsen *et al.*, 2009). Mientras que la proliferación de organismos como *Microthrix parvicella*, *Nostocoida limicola*, Tipo 1863, tipo 021N y 0041 se asocian con problemas de generación de espumas (Övez y Orhon, 2005; Leal *et al.*, 2016).

El desarrollo de bacterias filamentosas puede verse favorecido bajo ciertas condiciones del sistema tales como baja concentración de oxígeno disuelto (OD), baja tasa de carga orgánica, déficit de nutrientes, bajo pH, baja concentración de sustrato y baja temperatura (Guo *et al.*, 2014). En la **Tabla 6** se muestran las principales causas que favorecen el fenómeno de bulking, junto a los organismos filamentosos con los que se encuentran asociados.

**Tabla 6.** Condiciones asociadas al sobrecrecimiento de bacterias filamentosas. Adaptado de Tandoi *et al.*, 2017.

<b>Condiciones asociadas con el crecimiento de organismos filamentosos en lodos activados</b>	
<b>Condiciones causantes sugeridas</b>	<b>Organismo filamentoso</b>
<b>Bajo OD</b>	<i>H. hydrossis</i>
	<i>S. natans</i>
	Tipo 1701
<b>Baja relación alimento/microorganismo</b>	<i>H. hydrossis</i>
	<i>Nocardia</i> sp
	<i>Thiothrix</i> spp
	Tipo 0041
	Tipo 0675
	Tipo 1851
	Tipo 0803
	Tipo 0914
Tipo 0092	
<b>Deficiencia de nutrientes</b>	<i>Thiothrix</i> spp
	Tipo 021 N
	<i>N. limicola</i> II
<b>Ácidos grasos en aguas residuales</b>	<i>M. parvicella</i>

## **Bacterias filamentosas pertenecientes al filo *Chloroflexi* en sistemas de lodos activados**

Las bacterias filamentosas pertenecientes al filo *Chloroflexi* se encuentran comunmente en los sistemas de lodos activados y algunas de ellas han sido asociados a problemas de bulking. Yoon y colaboradores sugieren que las filamentosas de este filo cumplen un rol importante en estos sistemas proporcionando estabilidad estructural a los flóculos (2010). Sin embargo, su proliferación promueve la formación de puentes interfloculares, lo cual contribuye con el fenómeno de bulking.

Se han identificado bacterias filamentosas de este filo involucradas en el hinchamiento de lodo, las cuales habían sido descritas anteriormente por Eikelboom: B45 (tipo 0092), Candidatus Sarcinathrix (tipo 0914), *Kouleothrix* spp. (tipo 1851), P2CN44 (tipo 0803), 0675 y 0041 (McIlroy *et al.*, 2016; Spiers *et al.*, 2017). Algunos miembros poseen la particularidad de presentar bacterias epifíticas de la familia *Saprospiraceae* (C. 'Epiflobacter spp.') en su superficie, característica que es utilizada para la identificación microscópica (Xia *et al.*, 2008). A pesar de los esfuerzos realizados para obtener estos organismos en cultivo puro, ninguno de estos morfotipos cuenta con un representante aislado.

Con respecto a la utilización de sustratos, estudios realizados indican que son bacterias especializadas capaces de degradar e hidrolizar macromoléculas complejas tales como proteínas y polisacáridos (Kragelund *et al.*, 2007). Esto puede convertirse en una ventaja para su crecimiento ya que pocas bacterias formadoras de flóculos pueden degradar materia orgánica compleja (Nielsen *et al.*, 2009).

Gracias a las plataformas de nueva generación, estudios filogenéticos mediante el gen del ARNr 16S y el diseño de sondas específicas para FISH, se ha logrado clasificar algunos miembros del filo *Chloroflexi*. Sin embargo, en la actualidad aún se conoce poco sobre la diversidad de este filo en comunidades de lodo activado, donde se pueden observar en poblaciones pero aún muchos de sus

miembros continúan sin poder ser cultivados y clasificados taxonómicamente (Speirs *et al.*, 2017)

#### **1.3.4 Estrategias de control del bulking filamentoso**

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para dilucidar las causas del sobrecrecimiento de las bacterias filamentosas, en la actualidad aún no se han obtenido conclusiones concretas sobre los factores específicos que promueven su proliferación (Tandoi *et al.*, 2017). Por lo tanto, las estrategias empleadas para controlar el fenómeno de bulking en sistemas de lodos activados pueden ser específicas o no específicas. La aplicación de métodos no específicos tiene como objetivo eliminar las bacterias filamentosas, pero de forma paralela también afectan a todo el sistema (Milobeldzka *et al.*, 2016). Estos métodos combaten a las bacterias filamentosas causantes del bulking (por fuera del flóculo) mediante procesos tales como cloración, ozonización o la utilización de sustancias como el peróxido de hidrógeno. Estos métodos pueden solucionar el problema de manera transitoria pero no resuelve las causas que generan la proliferación de organismos filamentosos. Por otra parte, estos procesos son capaces de formar subproductos indeseables que afectan el medio ambiente y además, afectan a otras bacterias deteriorando la calidad del efluente (Martins *et al.*, 2004).

En cambio, los métodos específicos generan soluciones a partir del conocimiento de la ecofisiología de las bacterias filamentosas considerando los parámetros operacionales favorables para su crecimiento (Milobeldzka *et al.*, 2016). Generan condiciones del medio en el reactor que sean hostiles para las bacterias filamentosas y logre evitar su sobrecrecimiento, además de funcionar como método preventivo. Estos métodos, a diferencia de los inespecíficos, requieren la labor de identificar previamente los organismos filamentosos involucrados en el bulking, pero aún así son preferibles ya que pueden resolver el problema de forma permanente. El diseño de los métodos específicos considera las características del tratamiento y el tipo de aguas residuales tratadas (Hossain *et al.*, 2004). Para el control específico de bulking Jenkins *et al.*, 1984 establecieron los siguientes pasos:

- 1) Identificar las bacterias filamentosas causantes del bulking
- 2) A partir del diseño de la planta y los datos operacionales, deducir las causas probables del hinchamiento de lodo.
- 3) Si las causas probables sugieren una deficiencia de nutrientes, tomar medidas para el suplemento de nutrientes.
- 4) En el caso de causas como baja de OD o baja de F/M, implementar cambios como por ejemplo aireación adicional o compartimentación de la configuración del reactor.

Otra estrategia empleada como método específico para controlar el bulking es la implementación de un selector. Éste es un reactor que antecede al reactor biológico y su función es favorecer el desarrollo de microorganismos formadores de flóculos y no así el de filamentos. Este proceso se encuentra basado en las diferentes velocidades de absorción de sustrato que poseen estos tipos de organismos. En el selector existe una cantidad suficientemente alta de nutrientes que es aprovechada por los organismos que tienen una alta velocidad para la absorción de sustrato, que en general son las bacterias formadoras de flóculos y no las filamentosas. De esta manera se logra controlar la población de bacterias filamentosas en el reactor biológico, evitando el hinchamiento del lodo (Tandoi *et al.*, 2017). Cualquiera sea el método utilizado, es necesario identificar los filamentos responsables del bulking y conocer el estado actual del proceso de tratamiento junto con las condiciones operativas del sistema (D'Antoni *et al.*, 2017).

#### **1.4 Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados en Uruguay**

En Uruguay existen varios sistemas de lodos activados funcionando tanto para el tratamiento de efluentes industriales como domésticos. A pesar de que existen problemas de bulking y foaming en nuestro país, no existe ningún estudio donde se profundice en la determinación de las causas de dichos problemas ni en la caracterización de bacterias filamentosas. Organismos como OSE y DINAMA (MVOTMA) han publicado manuales que poseen información sobre el problema de bacterias filamentosas y pautas sobre su control. Estos manuales están

basados en reportes de otros países y no cuentan con información sobre dicho problema en nuestro país. Esto es un problema debido a que no necesariamente los responsables por los fenómenos de bulking son las mismas especies bacterianas en los reactores del Uruguay y las soluciones aplicadas en otros países pueden no ser eficaces para resolver los problemas locales.

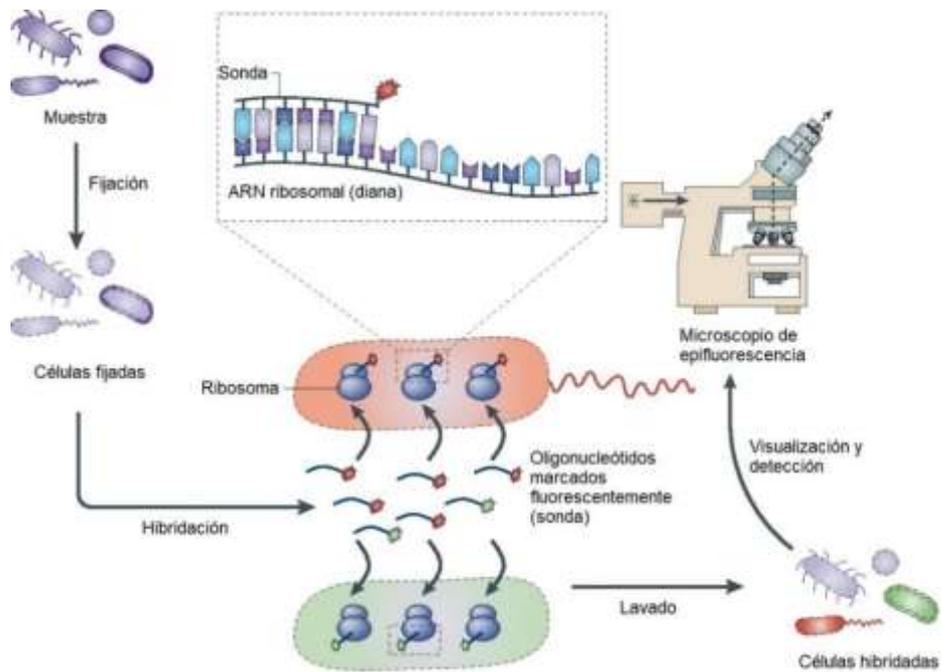
Debido a ello es pertinente realizar un estudio sobre las bacterias filamentosas predominantes en los sistemas junto con las condiciones operacionales. Así, se podrían generar estrategias de manejo adecuadas para disminuir o incluso evitar la proliferación de bacterias filamentosas en los sistemas aerobios de tratamiento. Esto generaría un mejor funcionamiento de los sistemas depuradores de agua frente a este fenómeno, lo que mejoraría la calidad del efluente y reduciría los costos de las industrias.

## **1.5 Bases de las técnicas de biología molecular Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y Secuenciación masiva del gen de ARN 16S**

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

FISH es una de las técnicas moleculares de desarrollo recientes (Moter y Gobel, 2000) de gran utilidad para identificar y cuantificar *in situ* las bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados. Su aplicación es relativamente fácil y rápida, permite descifrar la estructura de comunidades bacterianas en muestras ambientales (Nielsen *et al.*, 2009; Hesham, 2012; Wagner y Haider, 2012).

En FISH se utilizan sondas de ADN marcadas fluorescentemente, capaces de unirse en forma complementaria a su secuencia diana dentro de la célula. Dichas sondas se unen al ARN ribosomal 16S, los cuales se producen en un gran número de copias en células altamente activas, formando un híbrido ADN-ARN. Los híbridos formados son detectados posteriormente con un microscopio de epifluorescencia o microscopía de barrido láser confocal (CLSM) (Amann *et al.*, 1995; Moter y Gobel, 2000). En la **Figura 8** se muestra un esquema general de la técnica de FISH.



**Figura 8.** Esquema de la técnica hibridación *in situ* fluorescente. Adaptado del trabajo de Amann y Fuchs, 2008.

El proceso consiste en las siguientes etapas: fijación de la muestra, hibridación de la muestra con la sonda, lavados para remover la sonda, y montaje y visualización al microscopio. Las sondas consisten normalmente en oligonucleótidos de 15 a 30 pares de bases y las más utilizadas son las que se encuentran unidas a un fluoróforo (Moter y Gobel, 2000). Su diseño puede ser dirigido hacia diferentes niveles taxonómicos (dominio, filo, familia, clase, orden) y deben ser lo suficientemente específicas para detectar un organismo o una población en particular.

La técnica de FISH posee una serie de ventajas en comparación con otras técnicas de detección e identificación de microorganismos (Lledías *et al.*, 2013):

- No requiere cultivo puro ni extracción de ADN
- Es capaz de detectar más de una especie o género en una muestra gracias a la posibilidad de utilizar varias sondas (una sonda por especie, género o grupo) con diferentes fluoróforos.
- Permite conocer directamente la abundancia de los microorganismos detectados.
- La morfología de la célula no sufre cambios

- Las preparaciones pueden durar años

Además, esta técnica permite diferenciar a las bacterias filamentosas que son muy similares morfológicamente pero filogenéticamente diferentes, problema que es muy difícil o imposible de realizar con el método convencional (tinción y microscopio óptico) (Nielsen *et al.*, 2009; Hesham, 2012).

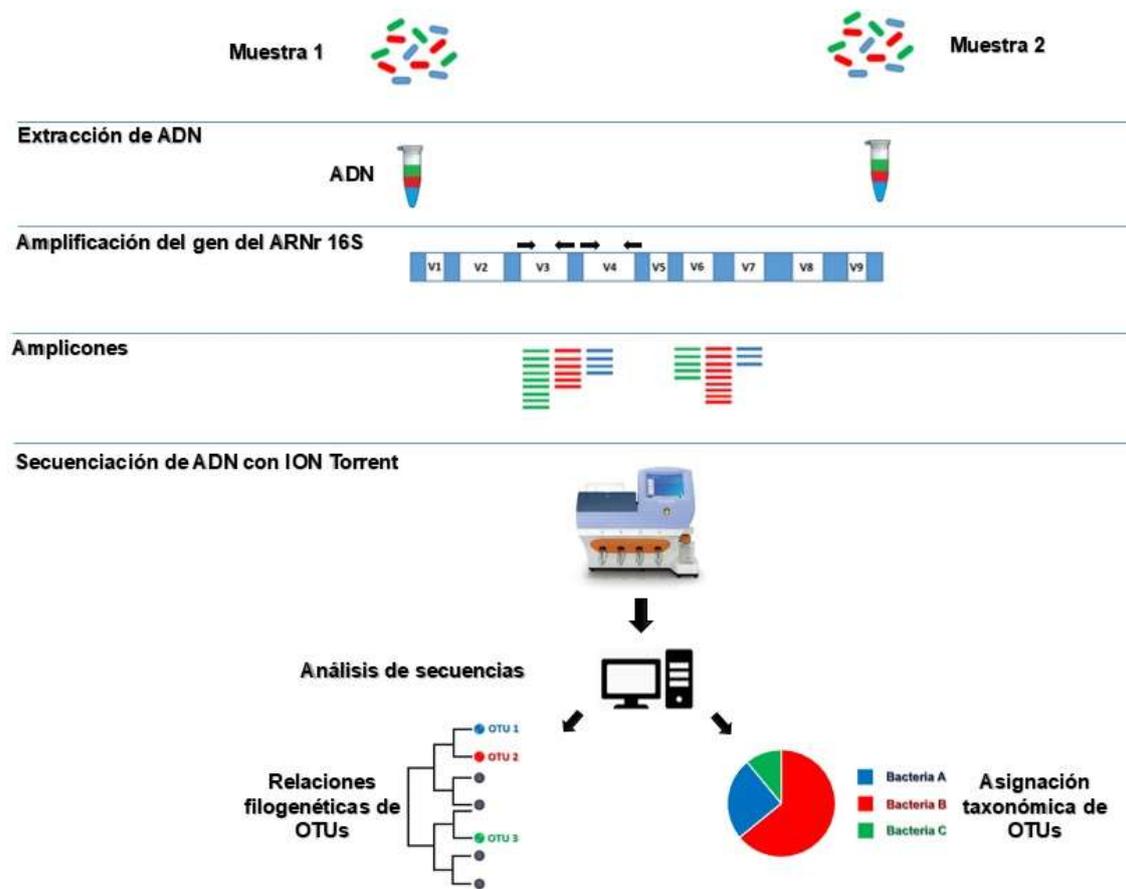
En los últimos años ha habido importantes mejoras en la técnica de FISH, proporcionando una mejor sensibilidad y detección de los microbios en muestras ambientales, brindando una herramienta fundamental de investigación para los microbiólogos ambientales (Wagner y Haider, 2012).

### **1.5.2 Secuenciación masiva del gen de ARNr 16S**

El análisis y la comparación de las secuencias del gen del ARNr 16S es una herramienta de gran utilidad para realizar la asignación y clasificación taxonómica de microorganismos (Rodicio y Mendoza, 2004). En ecología microbiana, este gen es ampliamente utilizada para obtener información sobre la diversidad biológica perteneciente a entornos naturales. Mediante el análisis de este gen se es capaz de identificar de forma precisa las bacterias y detectar los cambios en las comunidades microbianas a través del tiempo y/o bajo diferentes condiciones ambientales (Tringe y Hugenholtz, 2008). Debido a las características particulares del gen del ARNr 16S tales como la estructura altamente conservada, universalidad, regiones hipervariables y largo de secuencia (alrededor de 1500 pares de bases) suficiente para reducir fluctuaciones estadísticas durante el análisis informático, permite estudiar las relaciones filogenéticas bacterianas (Janda y Abbott, 2007).

Convencionalmente, se realiza mediante la clonación y secuenciación de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) de las amplificaciones por PCR, pero la aparición reciente de los secuenciadores de siguiente generación (Next generation sequencing, NGS), permitieron procesar una alta cantidad de secuencias (Sanschagrin y Yergeau, 2014). La tecnología de NGS brinda información detallada acerca de las comunidades bacterianas y permite cuantificar la abundancia relativa de los

organismos presentes. Además, permiten obtener una gran cantidad de secuencias de ADN de forma paralela en muy poco tiempo y a un costo reducido. (Guo *et al.*, 2013; Ceuppens *et al.*, 2017). El proceso para secuenciar los genes del ARNr 16S comienza con la extracción de ADN de las muestras de interés (**Figura 9**).

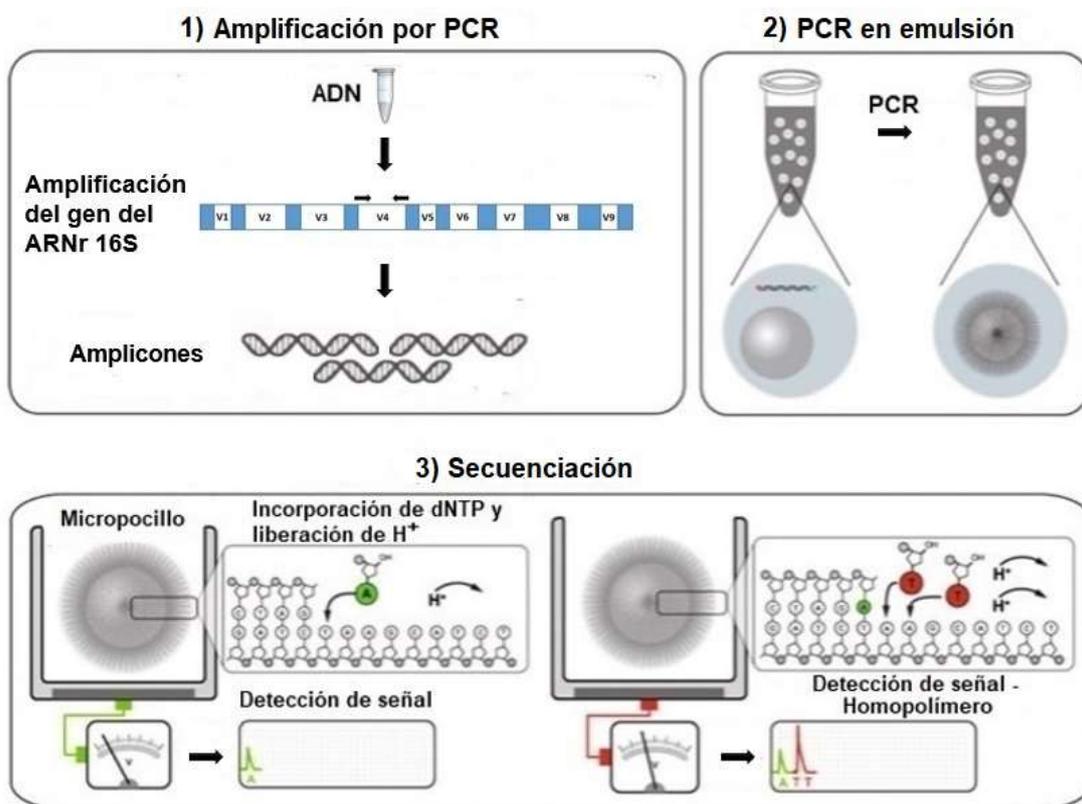


**Figura 9.** Esquema general del proceso de secuenciación masiva del gen ARNr 16S utilizado la plataforma tecnología NGS (ION Torrent).

Posteriormente el ADN extraído es amplificado por PCR utilizando cebadores universales para las regiones hipervariables del gen del ARNr 16S. Los amplicones son secuenciados mediante una plataforma NGS (por ej. ION Torrent), la cual finalmente genera un archivo con toda la información de las secuencias. Estas se filtran y los datos obtenidos se analizan utilizando herramientas bioinformáticas. En base a la similitud de secuencias, es posible agruparlas en unidades taxonómicas operacionales (OTU) y permitiendo la asignación de grupos taxonómicos. El análisis de las secuencias también brinda

información sobre las abundancias relativas de los organismos presentes en cada muestra (Tringe y Hugenholtz, 2008; Sanschagrín y Yergeau, 2014).

Dentro de la variedad de tecnologías NGS disponibles, ION Torrent es una de las plataformas de secuenciación masiva que provee un funcionamiento de forma rápida, simple y menos costosa. Fue lanzada en el año 2010 y posee dos tipos de sistemas de secuenciación: máquina del genoma personal (PGM) para el uso a pequeña escala y Ion Proton, que puede brindar un mayor rendimiento de datos (Chandran, 2018) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema representativo del proceso de secuenciación con ION Torrent. **1)** Amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR. **2)** Amplificación de amplicones acoplados a pequeñas bolas a través de PCR en emulsión. **3)** Secuenciación del ADN. Micropocillo con bolita, ADN polimerasa y dNTPs. Imagen modificada de Chandran, 2018.

Los amplicones generados se acoplan a pequeñas bolas mediante una PCR en emulsión, que luego son incorporados en micropocillos de un chip junto con la ADN polimerasa y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP). El chip funciona como un semiconductor capaz de detectar los cambios de pH generados por la

incorporación de nucleótidos. La adición de un dNTP provoca la liberación de un ion hidrógeno que activa un sensor, el cual es capaz de detectar el nucleótido, transformando la señal eléctrica en secuencias de bases. Esta información es transferida a un ordenador, donde se pueden generar lecturas de 200 pares de bases hasta un total de 10 Gb (López de Heredia, 2016; Mohinudeen *et al.*, 2017). Las lecturas generadas son sometidas a un análisis bioinformático que consta de tres etapas: pretratamiento de las secuencias en bruto, estudio de diversidad microbiana, y análisis de datos y visualización. Para llevar a cabo este tipo de análisis existen varios softwares disponibles tales como QIIME, mothur, MEGAN, VAMPS y RDP (Ju y Zhang, 2015).

En la presente tesis estudiamos las bacterias filamentosas en tres reactores aerobios en colaboración con Estudio Pittamiglio quienes han detectado eventos de bulking en dichos reactores. Para el estudio de dichas bacterias utilizamos las técnicas moleculares como ser FISH y secuenciación masiva del gen de ARNr 16S, así como observación a microscopio óptico por contraste de fases y evaluación macroscópica del lodo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de reactores

Se analizaron muestras de lodos activados pertenecientes a tres reactores de sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales de Uruguay: maltería (MO), bebidas analcohólicas (BA) y residuos hospitalarios (RH). Las muestras fueron proporcionadas mensualmente por la consultora ambiental Estudio Pittamiglio. En la **Tabla 7** se muestran las fechas de extracción de las muestras para cada reactor .

**Tabla 7.** Fechas de la toma de muestras del reactor correspondiente a cada industria y estudios realizados.

Muestras	MALTERÍA (MO)	BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS (BA)	RESIDUOS HOSPITALARIOS (RH)	Microscopía óptica	FISH
	Fechas				
1	27/5/2016	20/5/2016	31/5/2016	SI	NO
2	8/8/2016	10/8/2016	10/8/2016	SI	SI
3	30/8/2016	1/9/2016	1/9/2016	SI	SI
4	19/9/2016	20/9/2016	19/9/2016	SI	SI
5	25/10/2016	26/10/2016	26/10/2016	SI	SI
6	3/11/2016	3/11/2016	11/11/2016	NO	NO
7	28/3/2017	24/3/2017	-	SI	SI
8	-	26/4/2017	-	SI	SI
9	9/5/2017	10/5/2017	10/5/2017	SI	SI
10	23/5/2017	24/5/2017	24/5/2017	SI	SI
11	13/6/2017	15/6/2017	15/6/2017	SI	SI

### 2.1. Observaciones macroscópicas de lodos

Se observaron y registraron características de las muestras de lodos tales como color y sedimentación. La sedimentación del lodo se midió cualitativamente en función de su altura observada en el frasco. Las imágenes obtenidas de las observaciones realizadas se muestran en el **Anexo 1**. La clasificación de protozoos se realizó basada en el manual de «Protozoos en el fango activo» perteneciente al curso de Microbiología de lodos activados (GBS).

## 2.2 Observación microscópica de lodos

Se llevó a cabo el estudio de las características morfológicas y estructurales de los componentes (flóculos, bacterias filamentosas y protozoos) presentes en las muestras de lodos mediante la utilización de microscopía de contraste de fases. Para su observación se colocaron 20 µl de muestra (con previa agitación suave para homogeneizar la muestra) en un portaobjetos y sobre ella un cubreobjetos. Se utilizaron los aumentos 1000X, 400X y 1000X para observar y analizar las principales características morfológicas de los flóculos, las bacterias filamentosas y los protozoarios. Se tomaron fotos de las observaciones al microscopio para mantener un registro.

### Principales características morfológicas determinadas

FLÓCULOS: tamaño, forma, densidad

BACTERIAS FILAMENTOSAS: forma del filamento, morfología celular, localización, abundancia.

PROTOZOOS: abundancia y tipos de protozoos presentes considerados como bioindicadores

## 2.3 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Se realizó FISH a las muestras (un preparado por muestra) utilizando sondas dirigidas al filo *Chloroflexi*. La detección estuvo enfocada en este filo debido a que este ha sido ampliamente reportado como uno de los causantes de bulking en sistemas de lodos activados. Por otra parte, el equipo de la Dra. Claudia Etchebere ha trabajado durante años con sistemas de tratamiento de aguas residuales y en particular también con bacterias del filo *Chloroflexi*.

Específicamente se emplearon las sondas CFX 1223 (CCATTGTAGGGTGTGTGTMG) (Björnsson *et al.*, 2002) y GNSB 941 (AAACCACACGCTCCGCT) (Gich *et al.*, 2001). Estas fueron marcadas con el fluorocromo derivado de cianina (Cy3), el cual posee una longitud de onda de excitación a 550 nanómetros (nm) y emite señal a una longitud de onda de 570

nm (Moter and Gobel, 2000). También se utilizó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) como tinción para el ADN bacteriano total, la molécula es capaz de unirse al ADN y formar un complejo fluorescente. Uno de los picos de máxima absorción del DAPI es a 364 nm y emite señal a una longitud de onda de 453 (Kapusinski, 1995).

Para validar la técnica de FISH se utilizó como control negativo un cultivo puro de *Escherichia coli* y como control positivo un cultivo puro de *Sphaerobacter thermophilus* perteneciente al filo *Chloroflexi*. Las micrografías obtenidas de los controles se muestran en el **Anexo 2**.

Luego de la aplicación de las sondas las muestras fueron observadas a través de un microscopio confocal FluoView™ 300 Olympus® y también con microscopio laser confocal Zeiss LSM 800. Para observar la señal de las sondas en el Olympus FV 300 se utilizó el laser Ne-He 543 con el filtro BA560-600 y para la señal de DAPI se empleó el laser de diodo ultravioleta (405 nm) con el filtro 430-460. Por otra parte, para visualizar la sonda en el Zeiss 800 se utilizó el laser 543, mientras que para la señal de DAPI se trabajó con el laser 405.

#### Fijación de muestras

Para la fijación se centrifugaron 300 µl de muestra a 5000 g durante 10 min. Luego se llevó a cabo el lavado del pellet con 300 µl de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1X seguido de una centrifugación durante 10 min a 5000g. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 µl de PBS 1X. Posteriormente se agregaron 3 volúmenes (900µl) de paraformaldehído (PFA)-PBS 4% y se incubó a 4°C de 2 a 18 horas.. El siguiente paso fue incubar de 2 a 18 horas a 4°C y centrifugar a 5000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante nuevamente y se lavó el pellet agitando en vortex con 300µl PBS 1X. Una vez más se centrifugó a 5000g durante 10 minutos y se resuspendió en 300µl de PBS 1X. Finalmente se agregó igual volumen de EtOH absoluto (300µl) y se almacenó a -20°C. También se realizaron otras fijaciones de la misma manera pero se sustituyó el PFA con etanol absoluto para la detección de bacterias gram positivas.

## Hibridación

Como primera etapa de la hibridación se llevó a cabo el secado de las muestras en un portaobjeto. Se agregaron 10µl de muestra en el portaobjeto y se dejó secar al aire o estufa a un máximo de 55°C. Luego se agregó 1 ml de EtOH 50% para deshidratar y se dejó actuar durante 3 minutos, posteriormente se realizó el mismo paso con EtOH 80% y 96%, se dejó secar al aire. Previamente a la hibridación con la sonda, se preparó el buffer de hibridación con las siguientes soluciones:

Se colocaron 10 µl de buffer de hibridación. Para preparar 2 ml de buffer y las sondas utilizadas:

### *Buffer de Hibridación*

- 40µl Tris-HCL 1M pH 8
- 360µl de NaCl 5M
- 700µl de formamida (35%)
- 900µl de agua ultrapura
- 2µl de SDS (se agregó al final para evitar que precipite)

La cantidad de buffer utilizado se preparó en base a que cada portaobjeto requirió 10µl. Luego de agregar el buffer se colocaron 2µl (1µl de cada sonda (50 ng/µl)) de sonda a cada muestra (excepto a los controles negativos) y se llevó a cabo la incubación a 46°C durante 3 horas. Se preparó una muestra correspondiente a cada reactor, por lo tanto fueron tres muestras junto con sus controles negativos correspondientes, seis muestras en total. Los controles negativos se realizaron con el agregado de (DAPI) y sin sonda.

## Lavados

Luego de la hibridación con la sonda se procedió a remover el buffer de hibridación con 1 ml de buffer de lavado previamente calentado a 48°C. Dicho buffer se preparó en el momento de ser utilizado, poco antes del lavado.

El buffer de lavado se preparó con las siguientes soluciones

Buffer de lavado: para 50 ml

- 1 ml Tris-HCl 1M pH 8
- 500µl EDTA 0,5 M

- 700µl NaCl
- Agua ultrapura hasta 50 ml
- 50µl de SDS (se agregó al final)

Una vez preparado el buffer de lavado y calentado a 48°C se lavaron las muestras fijadas en los portaobjetos agregando 2 ml del preparado. Luego se agregó una solución de DAPI de concentración de 0,025µl/ml al buffer restante para luego sumergir los preparados, se incubaron a 48°C por 10 min. Posteriormente se lavó cuidadosamente el portaobjeto con agua ultrapura o destilada fría y se secó en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez que las muestras se secaron adecuadamente, se agregaron 3µl de CitiFluor™ (una gotita) y se cubrió con cubreobjeto. Las muestras se observaron al microscopio y se almacenaron a -4°C en oscuridad.

Se guardaron micrografías control (solo con DAPI) con su imagen correspondiente de la sonda y también su superposición (merge). Luego las micrografías obtenidas se procesaron con el programa Fiji el cual es adecuado para procesar las imágenes.

## **2.4 Secuenciación masiva**

Se realizó secuenciación masiva del gen de ARNr 16S con primers para el Dominio Bacteria de una muestra por reactor y las secuencias obtenidas se analizaron utilizando QIIME. Dichas muestras correspondieron a las fechas: MO (3/11/2016), BA (3/11/2016) y RH (11/11/2016).

### **2.4.1 Extracción de ADN, amplificación y purificación**

Para la extracción de ADN se realizó una centrifugación de las tres muestras por duplicado durante 1 minuto a 7000 g. Los duplicados se unieron. Los pesos de las muestras obtenidas fueron de 0,28 g (MO), 0,30 g (BA) y 0,36 g (RH) con un volumen de 2 ml cada una. Se extrajo el ADN utilizando el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit según las especificaciones del fabricante (**Anexo 3**).

Posteriormente, la cantidad e integridad del ADN extraído fue verificado en gel de agarosa 1% (p/v) y se almacenó a -20°C.

Utilizando como molde las extracciones obtenidas se amplificó el gen del ARNr 16S mediante PCR (**Anexo 4**). Para esta reacción se emplearon los cebadores 520F (5-AYTGGGYDTAAAGNG-3') y 802R (TACNNGGGTATCTAATCC) (Claesson *et al.*, 2009). Se utilizaron barcodes de 10 pb (tag) para identificar las muestras luego de la secuenciación. Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% (p/v). Del mismo se extrajeron las bandas para su posterior purificación mediante la utilización del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery según las especificaciones del fabricante (**Anexo 5**). Finalmente, la integridad y el tamaño del ADN purificado fue corroborado realizando electroforesis en gel de agarosa 1%.

#### **2.4.2 Secuenciación y Análisis bioinformático**

Las muestras de ADN del gen de ARNr 16S previamente amplificadas y purificadas fueron secuenciadas utilizando el equipo ION Torrent en la plataforma de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable» (IIBCE). Las secuencias obtenidas fueron procesadas mediante el software QIIME versión 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010). El software QIIME permite hacer el procesamiento de las muestras el cual consiste en: eliminación de primers y barcodes, filtrado de secuencias por calidad, detección y filtrado de quimeras, agrupación de OTUs y posteriormente permite hacer la clasificación taxonómica.

A partir del script *split\_libraries.py* se realiza el pre-procesamiento de las secuencias que están inicialmente en formato fastq. En esta etapa, se asigna a cada barcode una de las muestras secuenciadas, se eliminan las secuencias de baja calidad (calidad menor a 25), primers y secuencias que están fuera de 200-320pb de largo. La detección de quimeras y su filtrado se realizó con los scripts *identify\_chimeric\_seqs.py* y *filter\_fasta.py*. A partir de estas secuencias procesadas las secuencias se agruparon en OTUs utilizando un umbral de identidad del 97%. Luego estas se clasificaron de acuerdo a su taxonomía

utilizando la base de datos Silva release 128. Mediante QIIME se exportó la tabla de OTUs para todas las muestras con su asignación taxonómica, la cual se utilizó para calcular abundancias relativas de los distintos grupos de interés. Por otro lado, se obtuvieron las secuencias representativas de cada OTU para realizar la construcción de un árbol filogenético para mejorar la clasificación taxonómica. El método de construcción utilizado fue el de máxima verosimilitud (Maximum-Likelihood) y se estableció un valor de bootstrap de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas de acuerdo con el método Tamura 2-p. La construcción del árbol se realizó utilizando MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), con el objetivo de analizar las relaciones filogenéticas de las OTUs más abundantes junto con secuencias de alta similitud. Estas últimas fueron obtenidas en la base de datos Genbank del servidor web National Center of Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta BLAST.

## 3. RESULTADOS

### Características macroscópicas

Las muestras de los tres reactores presentaron diferentes características macroscópicas. Las muestras de MO exhibieron color marrón, las de BA marrón oscuro y las de RH marrón claro. Estos colores no cambiaron durante los meses (ver **Anexo 1**).

Los niveles de sedimentación también fueron distintos para los tres reactores. MO presentó un nivel de sedimentación media mientras que BA y RH presentaron un nivel bajo (**Anexo 1**).

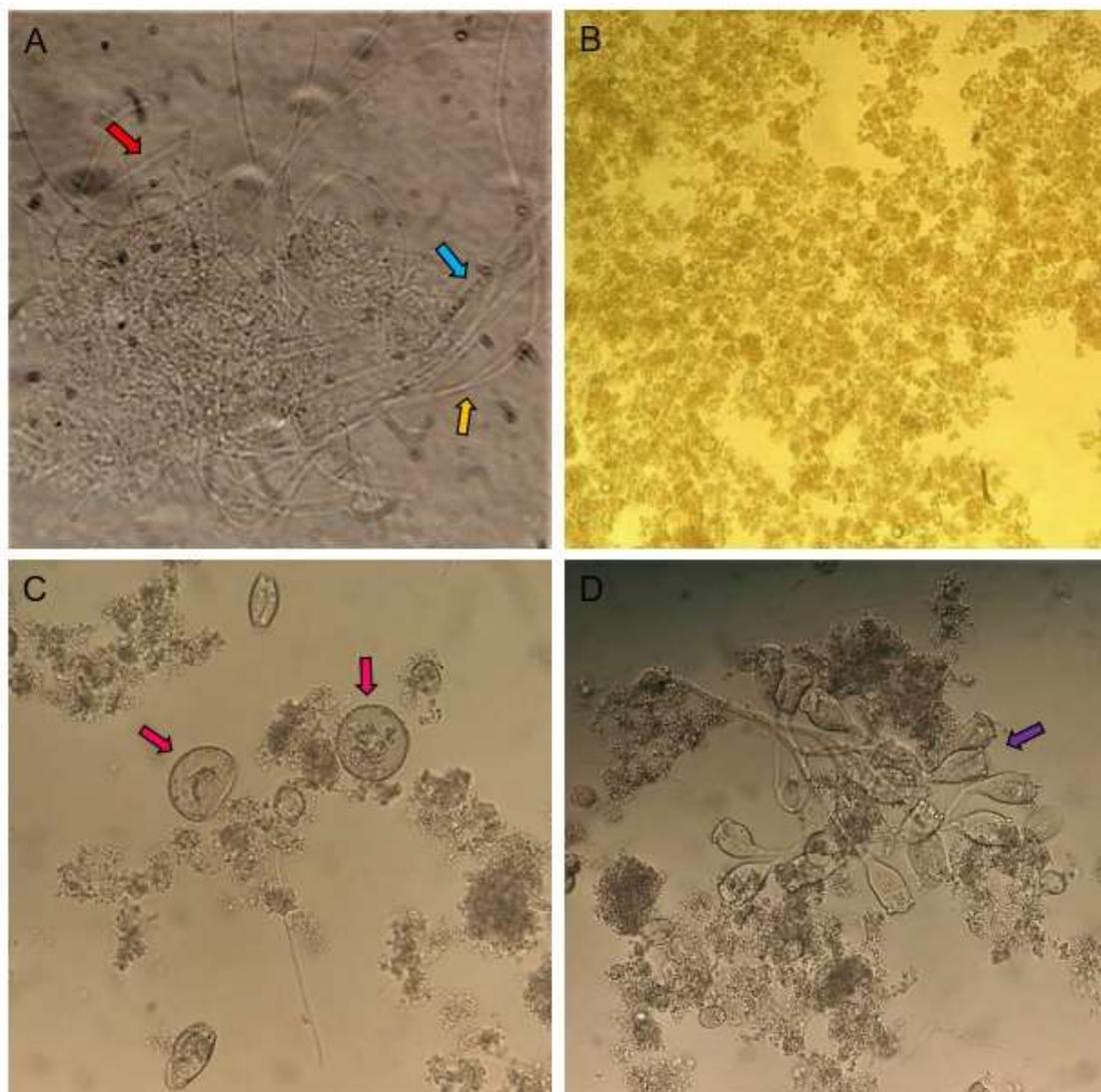
### 3.1 Características microscópicas

A través de la observación al microscopio de contraste de fases se detectaron diferencias en las características de la biomasa de los tres reactores estudiados así como en un mismo reactor a lo largo del tiempo en algunos casos. Se detectaron diferencias en la estructura flocular y la morfología de las bacterias filamentosas. Los resultados de estas características se muestran en las **Tablas 8 y 9**.

**Tabla 8.** Abundancia filamentosa relativa y características de los flóculos para cada reactor a través del tiempo.

Reactor	Fechas	Valor numérico	Abundancia filamentosa relativa	Flóculos	
				Forma	Estructura
MO	27/5/2016	4	muy comunes	irregular	abierta
	8/8/2016	5	abundantes	irregular	abierta
	30/8/2016	4	muy comunes	irregular	media
	19/9/2016	3	comunes	irregular	media
	25/10/2016	4	muy comunes	irregular	media
	3/11/2016	-	-	-	-
	28/3/2017	1	pocos	irregular	media
	-	-	-	-	-
	9/5/2017	2	algunos	irregular	media
	23/5/2017	1	pocos	irregular	media
	13/6/2017	1	pocos	irregular	media
BA	20/5/2016	6	excesivos	irregular	media
	10/8/2016	4	muy comunes	irregular	abierta
	1/9/2016	5	abundantes	regular	media
	20/9/2016	3	comunes	irregular	abierta
	26/10/2016	2	algunos	irregular	media
	3/11/2016	-	-	-	-
	24/3/2017	2	algunos	irregular	abierta
	26/4/2017	1	pocos	irregular	abierta
	10/5/2017	2	algunos	irregular	abierta
	24/5/2017	2	algunos	irregular	media
	15/6/2017	2	algunos	irregular	abierta
RH	31/5/2016	6	excesivos	regular	media
	10/8/2016	5	abundantes	irregular	media
	1/9/2016	6	excesivos	irregular	media
	19/9/2016	5	abundantes	irregular	media
	26/10/2016	6	excesivos	irregular	media
	11/11/2016	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	10/5/2017	6	excesivos	irregular	media
24/5/2017	5	abundantes	irregular	media	
15/6/2017	5	abundantes	irregular	media	

En el reactor MO se observaron bacterias filamentosas con tres morfologías distinguibles las cuales se muestran señaladas con flechas en la **Figura 11.A**.



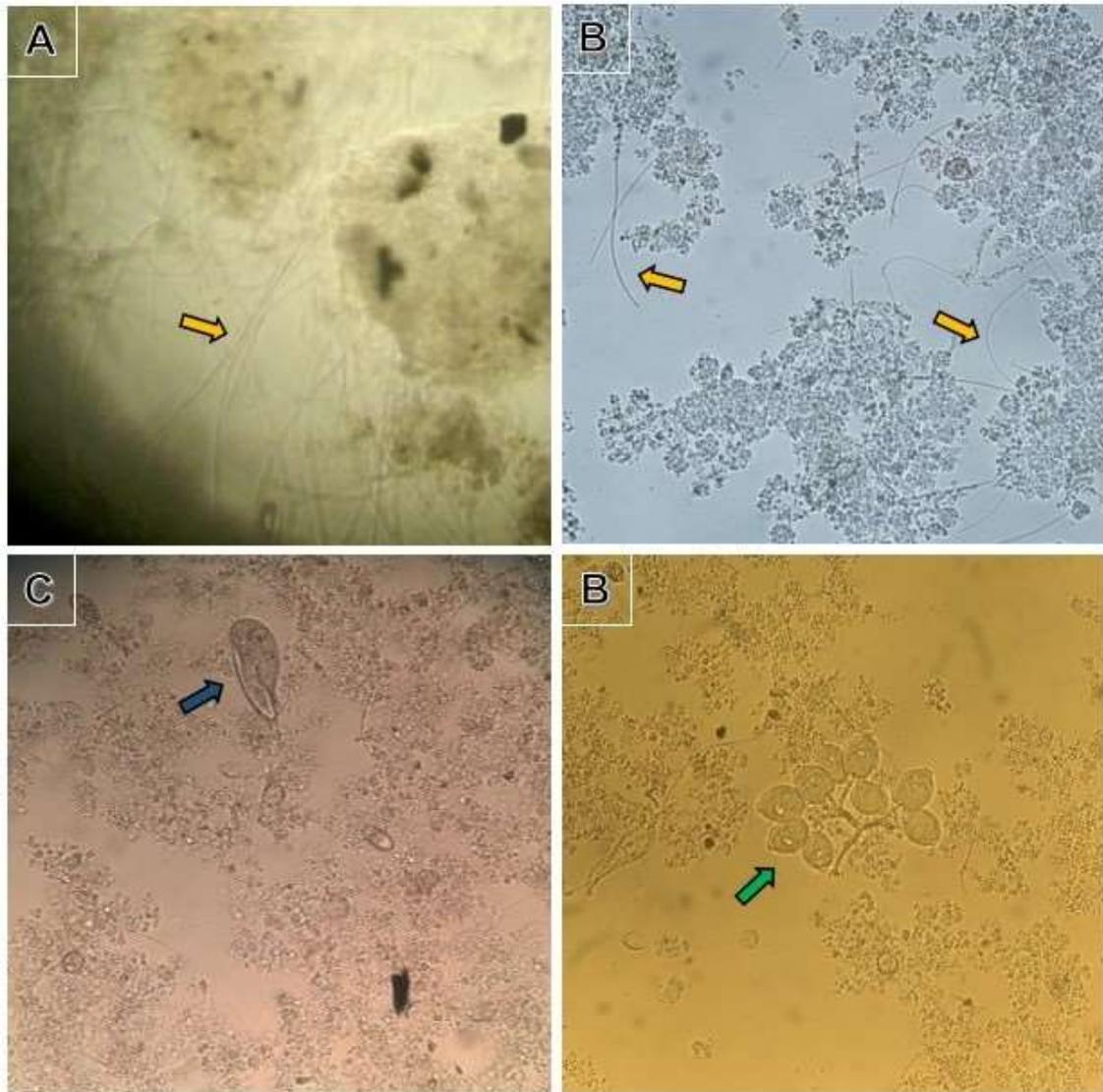
**Figura 11.** Imágenes obtenidas de las muestras de MO a través del microscopio de contraste de fases Olympus Vanox. **A)** Aumento 1000X, fecha: 25-10-2016. Flóculo con bacterias filamentosas. Flecha roja: filamento recto; flecha celeste: filamento grueso con septos; flecha amarilla: filamentos largos. **B)** Aumento 400X, fecha: 28-3-2017. Flóculos irregulares **C)** Aumento 400X, fecha: 23-5-2017. Flóculos y protozoos. Flechas rosa: amebas testáceas. **D)** Aumento a 400X, fecha: 23-5-2017. Flóculos y protozoos. Flecha violeta: protistas alveolados.

La flecha amarilla señala filamentos largos y ligeramente curvados, mientras que la roja muestra otros más cortos y rectos. Los primeros se observan dispuestos en el espacio interflocular mientras que los cortos se observan sobre el flóculo. Con flecha celeste se muestra un filamento mas grueso en el espacio interflocular con septos visibles. Este tipo de filamento se observó raramente, por el contrario, las dos morfologías mencionadas anteriormente se detectaron con frecuencia (ver **Anexo 7**, MO). La disposición de estas últimas morfologías con respecto al flóculo se observaron de igual manera en todas las muestras a través

del tiempo con respecto a la abundancia filamentosa, en 2016 se pudo observar mayor cantidad (**Tabla 8**) comparado con los meses de 2017. Estos cambios se pueden apreciar en las imágenes correspondientes a MO que aparecen en el **Anexo 7**.

Las estructuras floculares en las muestras de este reactor se caracterizaron por presentar forma irregular (**Figura 11.B**) y estructura poco densa a través del tiempo. Sin embargo, en los meses del 2017 (ver **Anexo 7**) aumentó la cobertura superficial de los flóculos (superficie ocupada por los flóculos en el campo visual del microscopio). Además de los flóculos y las bacterias filamentosas, también se observaron distintas especies de protozoos presentes en las muestras. En la **Figura 11.C** aparecen amebas testáceas señaladas con flechas fucsia y en la **Figura 11.D** se observan protistas alveolados indicados con una flecha violeta. Entre los protozoos típicamente observados se encontraron rotíferos (género *Rotaria* y *Lecane*), protistas alveolados (sésiles), amebas testáceas y gastrotricos.

En las muestras pertenecientes a BA se observaron bacterias filamentosas largas y rectas ligeramente curvadas extendiéndose desde los flóculos, en el espacio interflocular y libres. Estos filamentos se pueden apreciar en la **Figura 12.A** y **12.B** señaladas con una flecha amarilla.

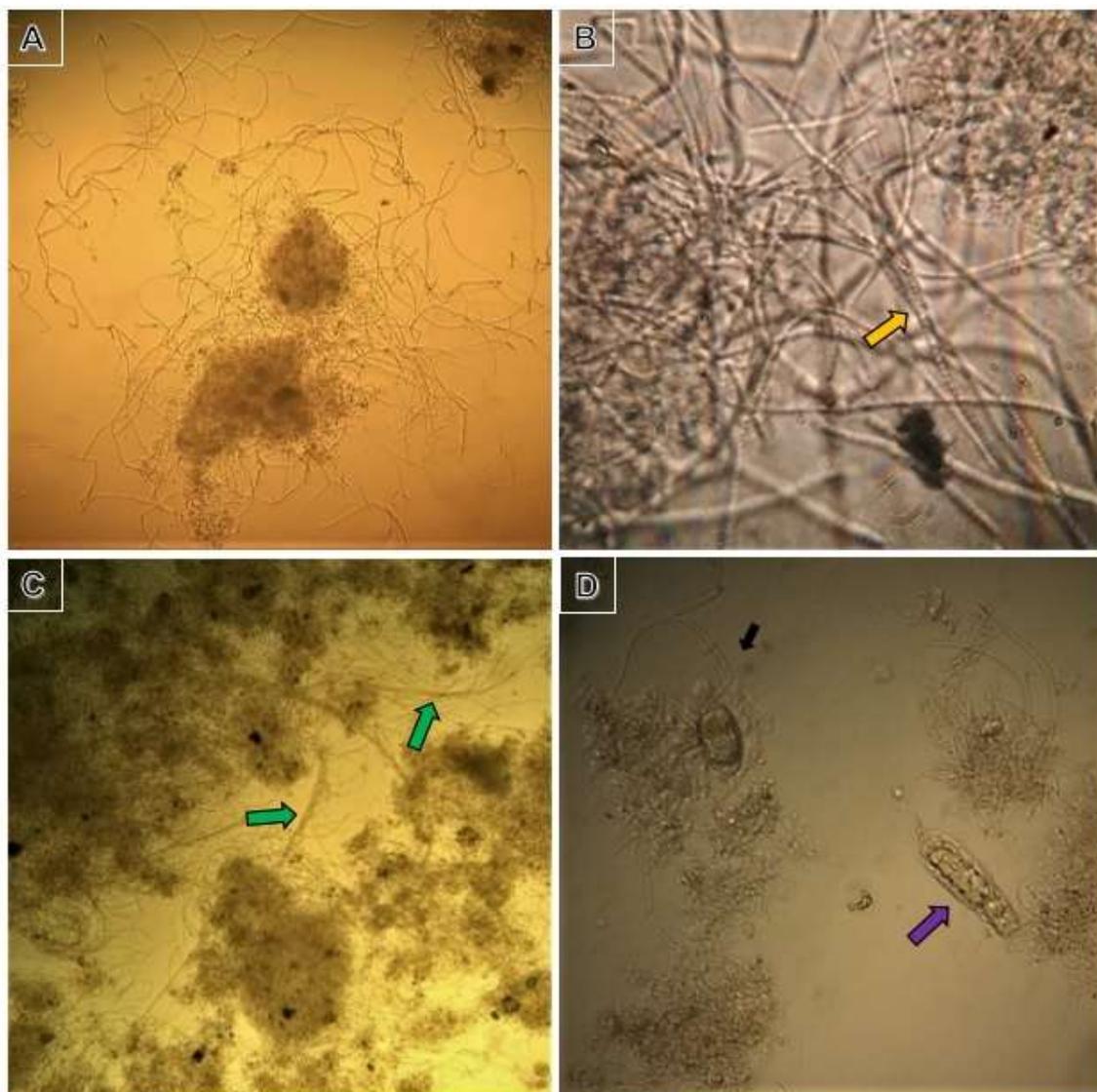


**Figura 12.** Imágenes obtenidas de las muestras de BA a través del microscopio de contraste de fases Olympus Vanox. **A)** Aumento 400X, fecha 20-5-2016. Flóculos con bacterias filamentosas. Flecha amarilla: filamentos largos y rectos. **B)** Aumento 400X, fecha 10-5-2017. Flóculos con presencia de bacterias filamentosas. Flechas amarillas: filamentos curvos **C)** Aumento 400X, fecha: 10-5-2017. Flóculos y protozoos. Flecha azul: protista alveolado (género *Paramecium*). **D)** Aumento a 400X, fecha: 26-4-2017. Flóculos y protozoos. Flecha verde: protistas alveolados.

También se observaron bacterias filamentosas con morfología celular ovalada y circular (ver **Anexo 7**: fecha 26-4-2017, aumento 1000X). Las estructuras floculares presentaban forma regular y de densidad media en los meses del 2016. Con respecto a los protozoos, se observó la presencia de protistas alveolados (*Blepharisma*) rotíferos y reptantes como se muestran en la **Figura 12.C** y **12.D**.

Al igual que en MO la abundancia de las bacterias filamentosas fue considerable en el año 2016 y luego disminuyó en el 2017. Las estructuras floculares fueron más regulares en los primeros meses del 2016 mientras que en 2017 se mostraron más abiertas. En este período tanto la densidad como la cobertura superficial de los flóculos aumentaron (ver fechas de BA 2017 en el **Anexo 7**).

En las muestras del reactor RH se observaron bacterias filamentosas muy torcidas (**Figura 13.A**) y a diferencia de estas, se detectaron filamentosas curvas (**Figura 13.C**). Ambas presentes en el espacio interflocular.



**Figura 13.** Imágenes obtenidas de las muestras del reactor RH a través de contraste de fases. **A)** Aumento 400X, fecha:1-9-2016. Flóculos con bacterias filamentosas torcidas. **B)** Aumento 1000X, fecha:1-9-2016. Diferentes morfologías de bacterias filamentosas. Flecha amarilla: filamento con células esféricas. **C)** Aumento 200X, fecha: 10-5-2017. Flóculos con bacterias

filamentosas. Flechas verdes: bacterias filamentosas levemente curvas. **D)** Aumento 400X, fecha: 24-5-2017. Flóculos y protozoos. Flecha violeta: Rotífero.

Con aumento a 1000X se pudo observar bacterias filamentosas septadas (**Figura 13.B**) y algunas con morfología celular esférica y discoidal (**Anexo 7**, fecha 26-10-2016. Aumento 1000X). Con ese aumento también se pudo apreciar la presencia de crecimiento epifítico (crecimiento perpendicular de bacterias sobre filamentos) en algunas filamentosas (ver fecha 19-9-2016, aumento 1000X. **Anexo 7**). Se observaron protozoos tales como sésiles, rotíferos (generos: *Cephalodella* y *Lecane*), protistas alveolados (género *Paramecium*) y gastrotricos (*Chaetonus*) (**Figura 13.D**).

En general, los filamentos torcidos se observaron en muestras de todas las fechas, y fue la morfología predominante. Los flóculos presentaron densidad media y su forma era aproximadamente regular a lo largo del muestreo. No se observaron estructuras abiertas, aunque aumentó la cobertura superficial de flóculos en algunos meses tales como en Junio del 2017.

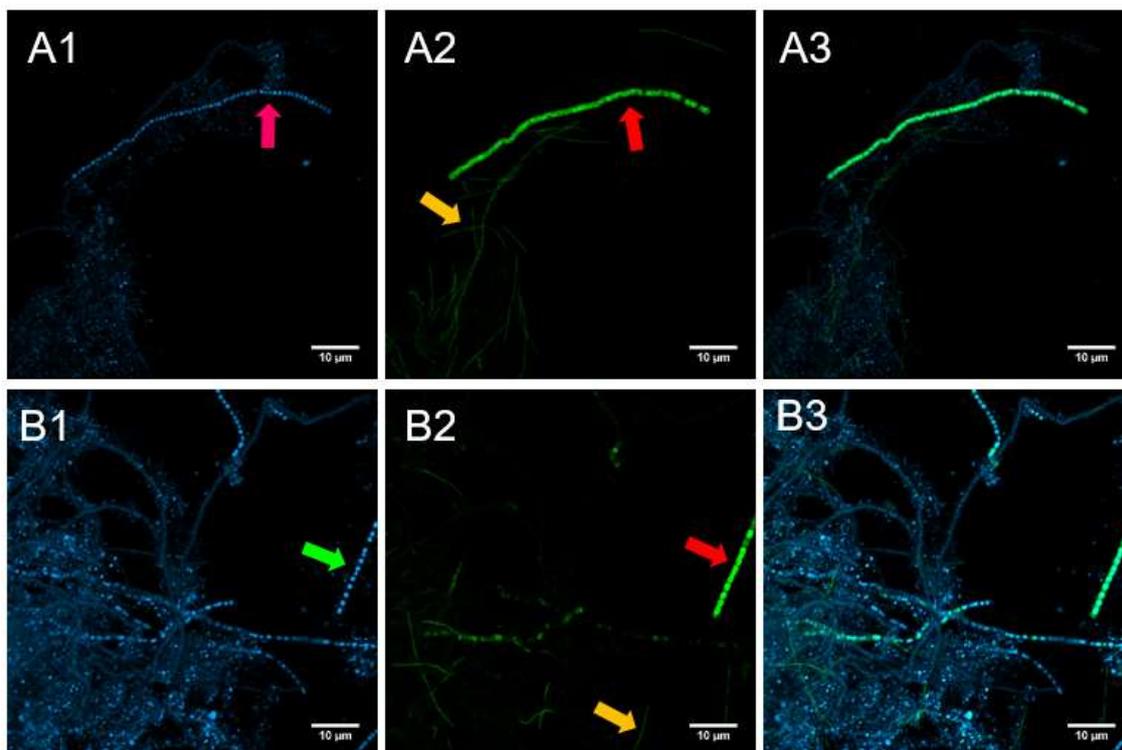
Comparando las muestras de los tres reactores, el de RH fue el que presentó una morfología característica de bacterias filamentosas predominantes (largas y torcidas) que no se observaron en los reactores de las industrias de MO y BA. Esta morfología en particular se observó durante todos los meses de muestreo y en algunas fechas específicas su cantidad fue abundante. Además, las estructuras floculares predominantes observadas fueron compactas durante los meses, mientras que para MO y BA se observaron generalmente estructuras menos densas. Con respecto a los protozoos, los tres reactores presentaron diferencias entre sí. Para las muestras pertenecientes a MO y BA se observaron de manera reiterada protistas alveolados (sésiles) y rotíferos. Además de estos dos microorganismos, en MO también se observaron con frecuencia amebas testáceas. Mientras que en RH predominaban los rotíferos. En la **Tabla 9** se muestran las características morfológicas de las bacterias filamentosas observadas en cada reactor.

**Tabla 9.** Principales características morfológicas de las bacterias filamentosas encontradas en los tres reactores.

Reactores	Características morfológicas		
	Forma de filamentos	Forma celular	Disposición
MO	Largos y ligeramente curvados	Discoidal y esférica	Espacio interflocular
	Cortos y rectos	Indefinida	Sobre el flóculo
BA	Largos y ligeramente curvados	Discoidal y rectangular	Espacio interflocular
	Cortos y rectos	Indefinida	Sobre el flóculo
RH	Largos y torcidos	Esférica	Extendiéndose desde el flóculo y libres
	Largos y curvos	Discoidal	Formando puentes interfloculares

### 3.2 Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

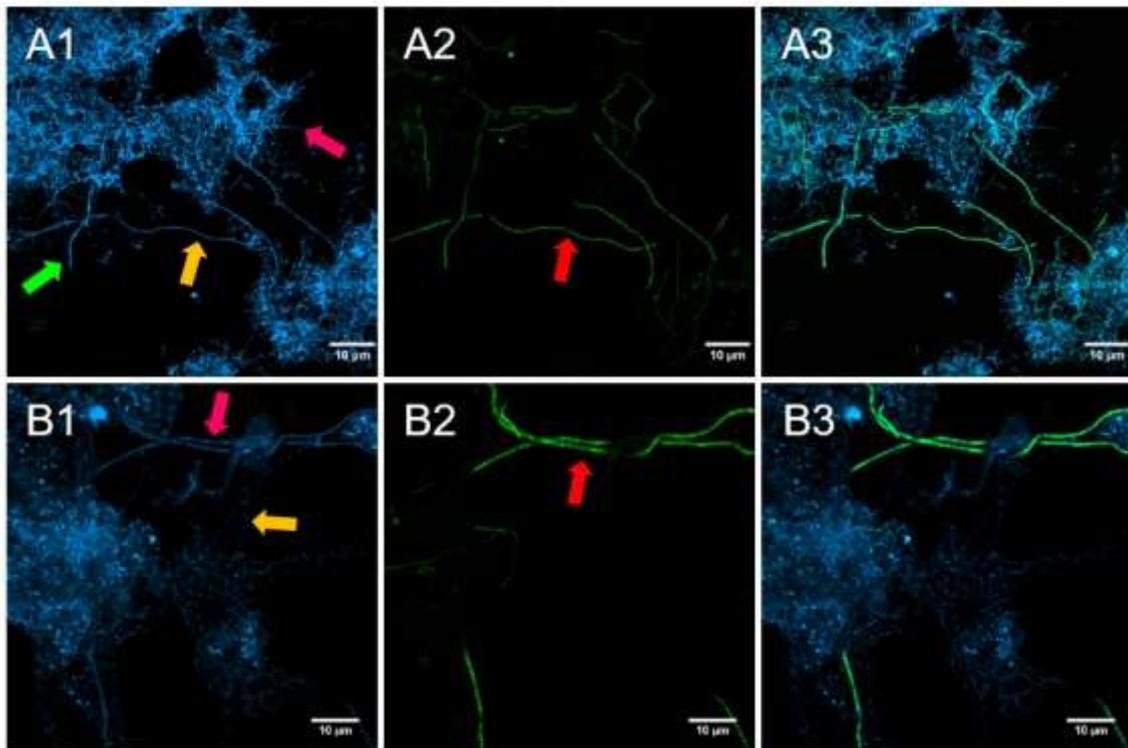
A través de la técnica de FISH se observó la presencia del filo *Chloroflexi* en los tres reactores. Las bacterias que hibridaron con las sondas específicas para este grupo se observan en color verde. Todas las bacterias positivas para la sonda presentaron morfología filamentososa y a su vez, se observaron bacterias filamentosas que no hibridaron con la sonda las cuales se observaron a través de tinción con DAPI. Se lograron distinguir diferentes morfologías y determinar la abundancia de las filamentosas *Chloroflexi* en los distintos reactores.



**Figura 14.** Micrografías de FISH con sondas específicas para el Filo *Chloroflexi* pertenecientes al reactor de MO. **A1-A3)** Fecha: 25-10-2016. Presencia de flóculos con bacterias filamentosas. Flecha rosa: filamento con células discoidales. **B1-B3)** Fecha: 25-10-2016. Filamentosas en estructura flocular y en el espacio interflocular con diferentes morfologías. Flecha verde: filamento con células esféricas; flechas: roja (filamento de mayor tamaño) y amarilla indicando filamentos positivos para la sonda (filamento de menor tamaño). Microscopio de laser confocal Zeiss 800 a 1000X. La figura 1 corresponde a la señal de DAPI, la 2 a la de sonda y la 3 a la superposición de 1 y 2.

Las filamentosas observadas en MO presentaron una baja abundancia de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* y su abundancia fue variable con el tiempo (**Tabla 10** y ver **Anexo 8**, MO). De las bacterias filamentosas positivas para la sonda, se lograron diferenciar distintas morfologías (**Tabla 11**). En la **Figura 14.A2** y **14.B2** se observan dos tipos de bacterias filamentosas morfológicamente distintas señaladas con flechas, mientras que en la **Figura 14.A3** y **14.B3** se puede apreciar que se encuentran sobre el flóculo. Con respecto a la morfologías celulares, en las **Figuras 14.A1** y **14.B1** se distinguen formas discoidales (flecha fucsia) y esféricas (flecha verde) respectivamente.

Las bacterias filamentosas que se observaron en BA se muestran en la **Figura 15**.

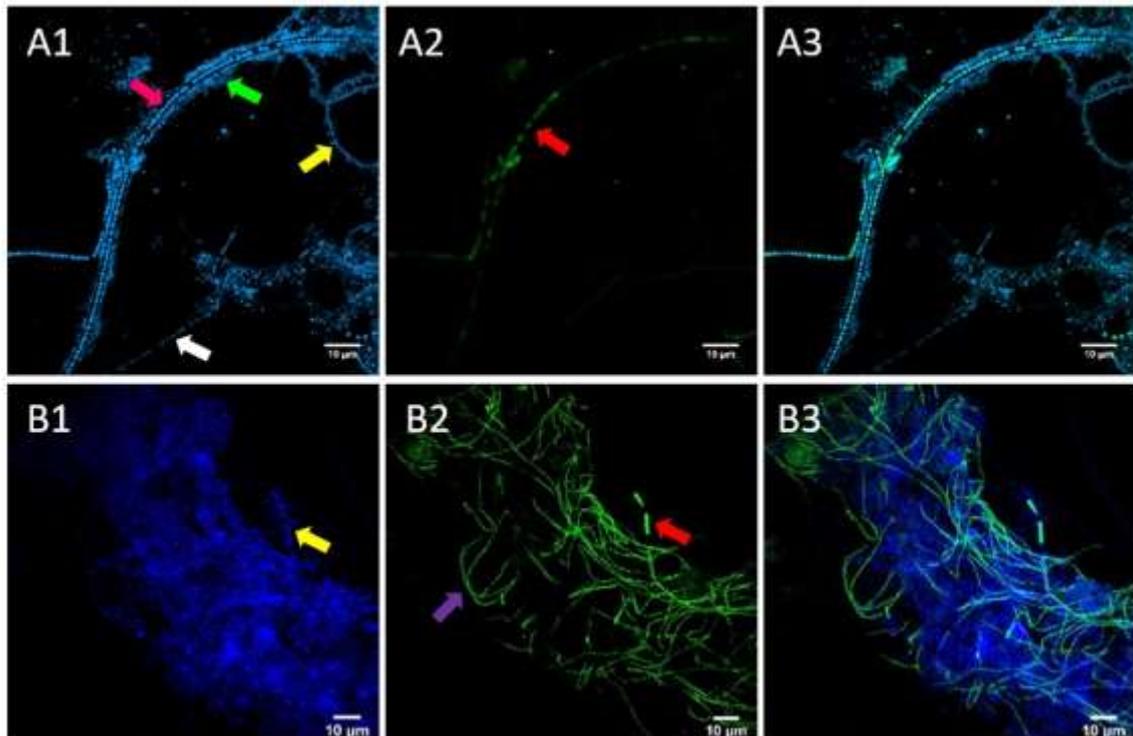


**Figura 15.** Micrografías de FISH con sondas específicas para el Filo *Chloroflexi* pertenecientes al reactor de BA. **A1-A2)** Fecha: 10-8-2016. Flóculos con pequeñas bacterias filamentosas rectas en él y con otras más grandes formando puentes interfloculares. Flechas: rosa (filamento recto); amarilla (filamento ligeramente curvado); verde (filamento de mayor tamaño); roja (filamento interflocular positivo para la sonda). **B1-B3)** Fecha: 26-10-2016. Diferentes bacterias filamentosas en el espacio interflocular. Flechas: rosa (filamentos con células discoidales); amarilla (filamento con células rectangulares); roja (filamentos de mayor tamaño positivos para la sonda). Microscopio de laser confocal Zeiss 800 a 1000X. La figura 1 corresponde a la señal de DAPI, la 2 a la de sonda y la 3 a la superposición de 1 y 2.

En general, se detectó una abundancia de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* media en la mayoría de las muestras (**Tabla 10**). Se observó un ligero aumento perteneciente a la muestra de la fecha 1-9-2016 (**Anexo 8**, BA). En la **Figura 15.A2** y **15.B2** se pueden observar diferentes morfologías de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* (ver también **Tabla 11**).

La disposición de estas bacterias filamentosas con respecto a los flóculos aparece en las imágenes **15.A3** y **15.B3**. Las más pequeñas aparecen sobre los flóculos mientras que las más grandes están formando puentes interfloculares. Las morfologías celulares se pueden apreciar mediante tinción con DAPI en la **Figura 15.A1** y **15.B1**.

Con respecto a RH, las muestras presentaron gran abundancia de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* (**Tabla 10**). Esta abundancia fue constante en la mayoría de las muestras analizadas (**Anexo 8**, RH). En la imagen **16.A2** y **16.B2** se ven filamentosas señaladas con flechas: en la primera la flecha roja señala un filamento largo y en la segunda imagen con flecha violeta se señalan filamentos más finos.



**Figura 16.** Micrografías de FISH con sondas específicas para el Filo *Chloroflexi* pertenecientes al reactor de MO. La sonda se observa en color verde y DAPI en azul. **A1-A3)** imagen con Microscopio de laser confocal Zeiss 800 a 1000X, **B1-B3)** imagen con Microscopio Olympus FV300 a 1000X. La figura 1 corresponde a la señal de DAPI, la 2 a la de sonda y la 3 a la superposición de 1 y 2.

Por otra parte, en **16.A1** las flechas rosa, blanca y amarilla muestran diferentes morfologías de bacterias filamentosas mientras que la verde muestra crecimiento epifítico. En **16.B1** también se observa crecimiento epifítico señalado con flecha amarilla.

Con respecto a la disposición de las bacterias filamentosas detectadas, en las **Figuras 16.A3** el filamento aparece en el espacio interflocular mientras que en la **Figura 16.B3** los filamentos en se encuentran sobre el flóculo.

En general, las muestras de RH presentaron mayor abundancia de bacterias filamentosas positivas comparado con las muestras de los otros reactores y dicha abundancia se mantuvo constante durante los meses analizados. De manera contraria, la abundancia de las bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* en MO y BA presentó grandes variaciones a lo largo del tiempo de operación de los reactores.

**Tabla 10.** Evaluación de la presencia de filamentosas que hibridan con sondas dirigidas al filo *Chloroflexi* a través del tiempo para cada reactor. Basado en las descripciones de Jenkins *et al.*, 1993; ninguno (-), pocos (+), algunos (++) , comunes (+++), dominantes (++++), excesivos (+++++).

Reactor	Fechas	Abundancia filamentososa relacionada con el filo <i>Chloroflexi</i>
MO	27/5/2016	No determinado
	8/8/2016	+
	30/8/2016	-
	19/9/2016	-
	25/10/2016	+++
	3/11/2016	No determinado
	28/3/2017	+
	-	
	9/5/2017	+
	23/5/2017	+++
	13/6/2017	-
BA	20/5/2016	No determinado
	10/8/2016	-
	1/9/2016	++++
	20/9/2016	++
	26/10/2016	++
	3/11/2016	
	24/3/2017	++
	26/4/2017	++
	10/5/2017	++
	24/5/2017	-
	15/6/2017	-
RH	31/5/2016	No determinado
	10/8/2016	+++
	1/9/2016	++++
	19/9/2016	++++
	26/10/2016	+++
	11/11/2016	No determinado
	-	
	-	
	10/5/2017	+++
	24/5/2017	++++
	15/6/2017	++++

**Tabla 11.** Tabla con las principales características morfológicas de las bacterias filamentosas *Chloroflexi* encontradas en las micrografías de FISH para cada reactor.

Reactores	Características morfológicas		
	Forma de filamentos	Forma celular	Disposición
MO	Largos y ligeramente curvados	Discoidal y esférica	Espacio interflocular
	Cortos y rectos	Indefinida	Sobre el flóculo
BA	Largos y ligeramente curvados	Discoidal y rectangular	Espacio interflocular
	Cortos y rectos	Indefinida	Sobre el flóculo
RH	Largos y torcidos	Esférica	Extendiéndose desde el flóculo y libres
	Largos y curvos	Discoidal	Formando puentes interfloculares

### 3.3 Secuenciación masiva del gen de ARNr 16S

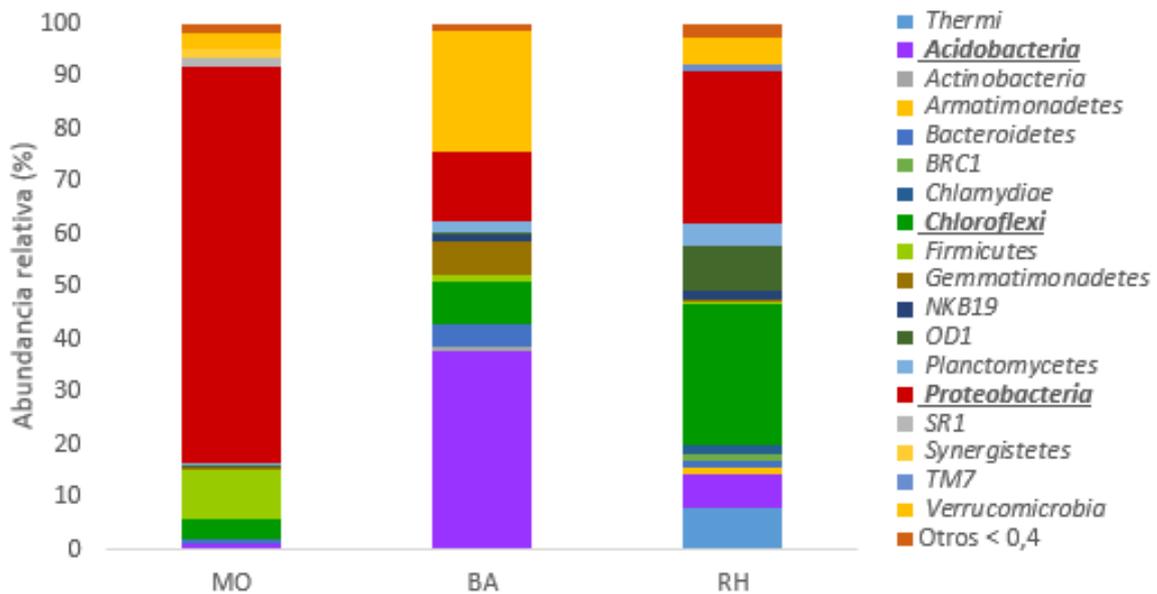
Se realizó secuenciación masiva del gen de ARNr 16S a una muestra de cada reactor para conocer la composición de las comunidades microbianas presentes e identificar posibles bacterias filamentosas además de las pertenecientes al filo *Chloroflexi*. Las muestras correspondieron al mes de noviembre de 2016 (**Tabla 7**). La información básica de las secuencias obtenidas de la secuenciación masiva se muestra en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Tabla de secuencias y OTUs obtenidas por secuenciación masiva para cada reactor.

Muestra	Cantidad de secuencias sin procesar	Cantidad de secuencias después de procesar	OTUs
MO	65915	63192	1309
BA	70199	68080	892
RH	50661	48697	929

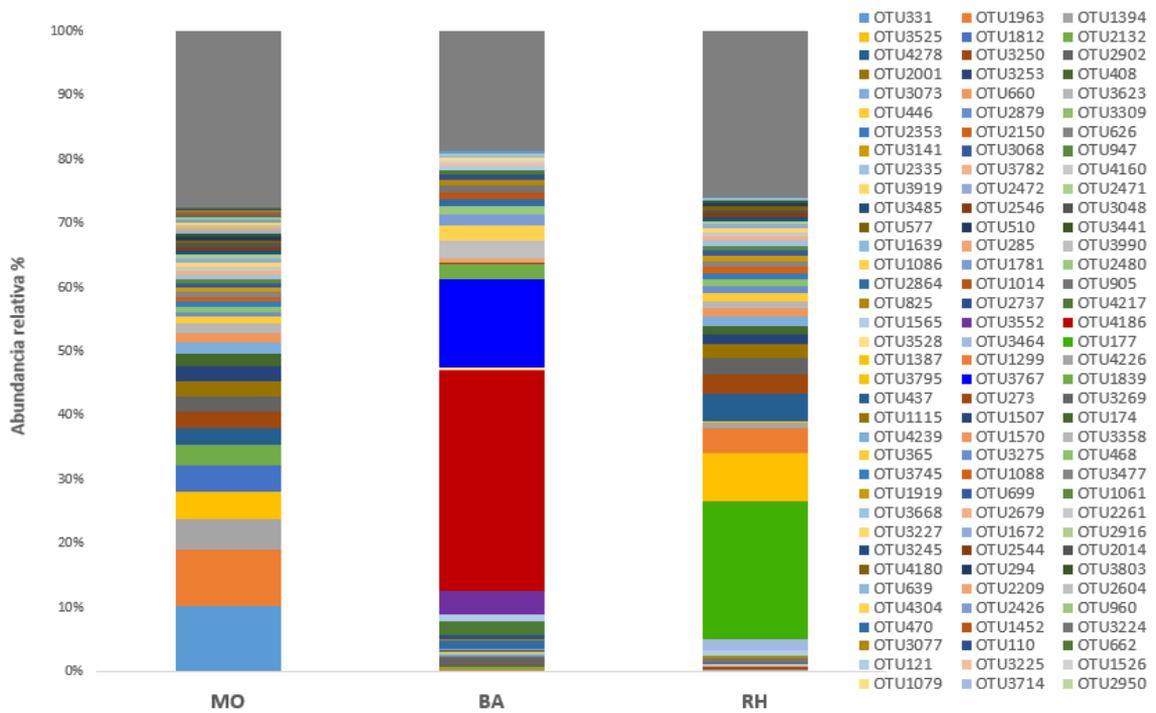
Se detectaron entre todas las muestras un total de 44 filos. Las comunidades de los tres reactores contenían los mismos filos principales pero con abundancias relativas diferentes. En RH se observó una mayor variedad de filos en comparación con los otros dos reactores y los filos que presentaron en común se encontraron en distintas proporciones. El filo *Proteobacteria*, el cual se

muestra en rojo en la **Figura 17**, fue el más abundante en MO y RH, con una abundancia de 75,1% y 28,6%, respectivamente, mientras que su abundancia sólo fue del 13,4% en BA. En este último, *Acidobacteria* fue el filo más predominante (violeta) (37,6%) pero su presencia en los otros dos reactores fue considerablemente menor. Otros filios predominantes fueron *Chloroflexi* y *Verrucomicrobia*. *Chloroflexi* presentó una abundancia de 26,86% en RH y *Verrucomicrobia* un 22,9% en BA, sin embargo la presencia de estos filios en MO fue inferior.



**Figura 17.** Abundancia relativa de los filios pertenecientes a cada reactor obtenidos a través de secuenciación masiva. Cada color corresponde a un filo diferente. Se subrayan los filios más predominantes.

Con respecto a las OTUs se obtuvieron 1309 OTUs en la muestra de MO, 892 OTUs en la muestra de BA y 929 OTUs en la muestra de RH. A este nivel las comunidades de los reactores presentaron una gran diversidad de organismos como se muestra con colores en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Abundancia relativa de las OTUs predominantes en cada reactor. Las OTUs menores al 0,4% en abundancia relativa fueron agrupadas y se muestran en color gris.

Para profundizar el análisis nos enfocamos en las 15 OTUs más abundantes en cada reactor. En la **Tabla 13** se puede observar la asignación taxonómica de dichas OTUs obtenida mediante la utilización del software QIIME.

OTU	Abundancia relativa (%)			Asignación taxonómica				
	MO	BA	RH	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
OTU 331	10,2	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thiotrichales</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Thiothrix</i>
OTU 1963	8,2	0,2	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	-
OTU 1394	4,6	0,1	0,2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>
OTU 3525	4,4	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Anaerospora</i>
OTU 1812	4,1	0,0	0,0	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>
OTU 2132	3,1	0,4	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	-
OTU 4278	2,6	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	-	-
OTU 3250	2,6	0,2	0,4	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Novosphingobium</i>
OTU 2902	2,4	1,3	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	-
OTU 2001	2,4	0,0	0,0	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Caldilinea</i>
OTU 3253	2,3	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	-
OTU 408	1,9	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	-	-
OTU 3073	1,6	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingobium</i>
OTU 660	1,6	0,0	0,0	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>
OTU 3623	1,5	0,0	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thiotrichales</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Thiothrix</i>
OTU 4186	0,0	34,3	0,0	<i>Acidobacteria</i>	<i>Chloracidobacteria</i>	<i>RB41</i>	<i>Ellin6075</i>	-
OTU 3767	0,0	13,8	0,0	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Methylacidiphilae</i>	<i>Methylacidiphilales</i>	<i>LD19</i>	-
OTU 3552	0,0	3,6	0,0	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemm-1</i>	-	-	-
OTU 2604	0,0	2,8	0,0	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Spartobacteria</i>	<i>Chthoniobacterales</i>	<i>Chthoniobacteraceae</i>	-
OTU 4304	0,0	2,5	0,0	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	-
OTU 1839	0,0	2,3	0,0	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Saprospirae</i>	<i>Saprospirales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	-
OTU 4217	0,1	2,1	0,0	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	-	-	-
OTU 2426	0,0	1,7	0,0	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutae</i>	<i>Opitutales</i>	<i>Opitutaceae</i>	<i>Opitutus</i>
OTU 2864	0,4	1,4	0,3	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogloea</i>
OTU 2902	2,4	1,3	0,0	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	-
OTU 960	0,0	1,2	0,0	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	-
OTU 470	0,0	1,1	0,0	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Oscillochloridaceae</i>	<i>Oscillochloris</i>
OTU 1565	0,1	1,1	0,8	<i>NKB19</i>	<i>TSBW08</i>	-	-	-
OTU 1452	0,0	1,1	0,0	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Methylacidiphilae</i>	<i>Methylacidiphilales</i>	<i>LD19</i>	-
OTU 3224	0,0	1,0	0,0	<i>Acidobacteria</i>	<i>Chloracidobacteria]</i>	<i>RB41</i>	<i>Ellin6075</i>	-
OTU 177	0,0	0,0	21,7	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	-	-	-
OTU 1387	0,0	0,0	7,5	<i>Thermi</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Thermales</i>	<i>Thermaceae</i>	<i>Meiothermus</i>
OTU 437	0,0	0,0	4,2	<i>OD1</i>	<i>ZB2</i>	-	-	-
OTU 1299	0,0	0,0	3,9	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	-	-
OTU 273	0,0	0,1	3,1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	-
OTU 3269	0,0	0,0	2,6	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Pedosphaerae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	-	-
OTU 1115	0,0	0,0	2,1	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria-6</i>	<i>iii1-15</i>	<i>RB40</i>	-
OTU 3464	0,0	0,0	1,7	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria-6</i>	<i>iii1-15</i>	<i>mb2424</i>	-
OTU 1507	0,0	0,0	1,5	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	-	-
OTU 174	0,0	0,1	1,5	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Oscillochloridaceae</i>	<i>Oscillochloris</i>
OTU 4239	0,0	0,0	1,4	<i>TM7</i>	<i>TM7-1</i>	-	-	-
OTU 1570	0,0	0,0	1,3	<i>OD1</i>	<i>ZB2</i>	-	-	-
OTU 3358	0,0	0,0	1,2	<i>Armatimonadetes</i>	<i>Fimbriimonadia</i>	<i>Fimbriimonadales</i>	<i>Fimbriimonadaceae</i>	<i>Fimbriimonas</i>
OTU 365	0,0	0,0	1,2	<i>Planctomycetes</i>	<i>028H05-P-BN-P5</i>	-	-	-
OTU 3275	0,0	0,0	1,1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Coxiellaceae</i>	<i>Aquicella</i>

**Tabla 13.** Tabla de OTUs predominantes para cada reactor con su abundancia relativa porcentual y su asignación taxonómica. Las OTUs con valores mayores a 10% se indican con color.

Diferentes OTUs fueron abundantes en los distintos reactores. Como se observa la abundancia relativa de cada OTU predominante, se ve claramente que muy pocas OTUs fueron detectadas como abundantes en más de un reactor (**Figura 19**).



**Figura 19.** Abundancia relativa de las 15 OTUs más abundantes en cada reactor. Las OTUs macadas con estrellas indican que podrían ser bacterias filamentosas.

Con el objetivo de determinar si alguna de las OTUs abundantes podrían ser bacterias filamentosas, se compararon las secuencias con la base de datos EzTaxon y se realizó una búsqueda bibliográfica según su asignación taxonómica resultante. En la **Figura 19** se marcan con una estrella las OTUs que podrían corresponder a bacterias filamentosas.

Por otra parte, las OTUs que presentaron similitud de secuencia con bacterias filamentosas mediante la utilización de EzTaxon, mostraron algunas diferencias con respecto a los grupos taxonómicos asignados con QIIME. Las OTUs más abundantes para cada reactor, las cuales podrían corresponder a bacterias filamentosas en base a la búsqueda en EzTaxon se muestran en la **Tabla 14**.

OTU	Filo	Clasificación	Abundancia relativa (%)		
			MO	BA	RH
OTU 177		Orden <i>Ardenticatenales</i>	0,0	0,0	21,7
OTU 2001	<i>Chloroflexi</i>	Familia <i>Caldilineaceae</i> Tipo 0803	2,4	0,0	0,0
OTU 960		<i>Litorilinea</i>	0,0	1,2	0,0
OTU 4304		Familia <i>Caldilineaceae</i> no clasificado	0,0	2,5	0,0
OTU 1299	<i>Alphaproteobacteria</i>	Candidatus <i>Alysiosphaera europaea</i>	0,0	0,0	3,9
OTU 1507		<i>Alysiosphaera</i>	0,0	0,0	1,5
OTU 1963	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Curvibacter</i> Related	8,9	0,2	0,0
OTU 331	<i>Gammaprotobacteria</i>	<i>Thiothrix unzii</i>	10,2	0,0	0,0
OTU 3623		<i>Thiothrix caldifontis</i>	1,5	0,0	0,0
OTU 660	<i>Firmicutes</i>	<i>Trichococcus</i>	1,6	0,0	0,0
OTU 1839	<i>Bacteroidetes</i>	Familia <i>Saprospiraceae</i>	0,0	2,3	0,0

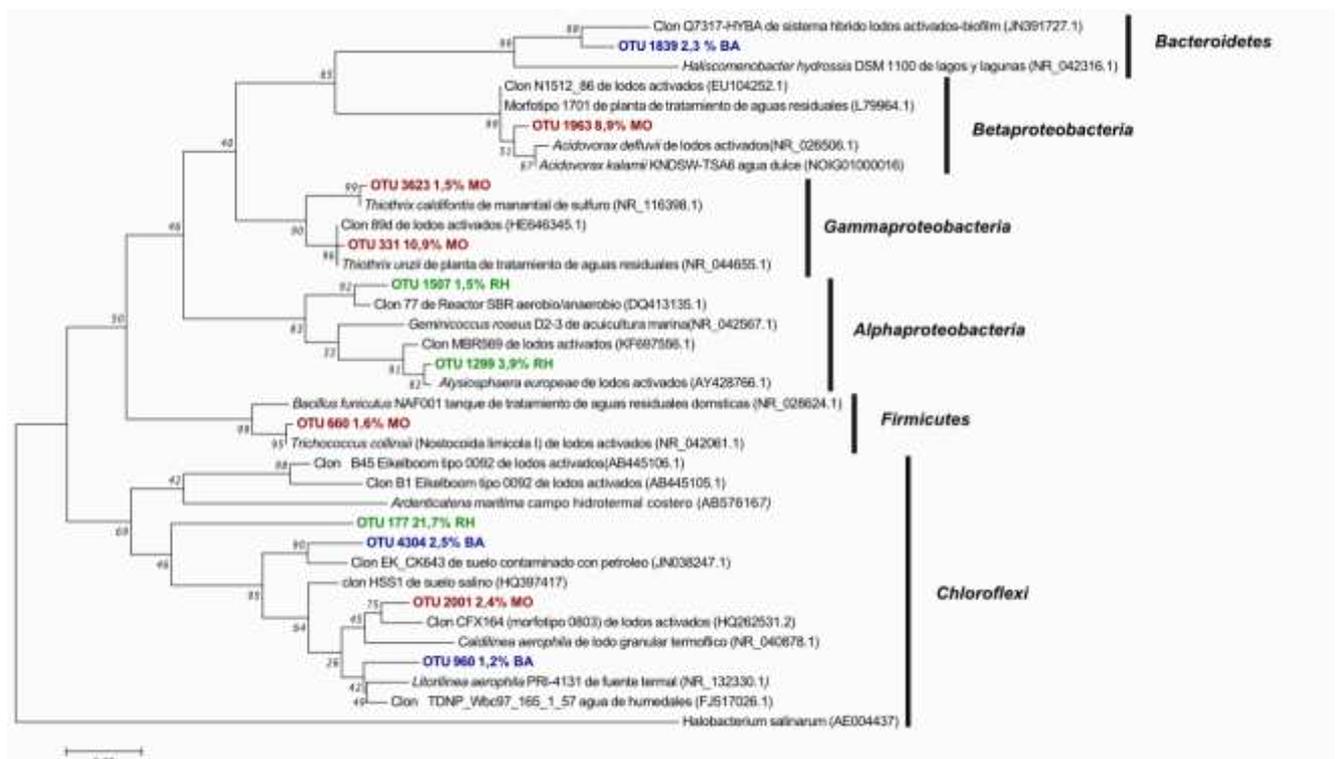
**Tabla 14.** Posibles bacterias filamentosas pertenecientes a las OTUs encontradas en cada reactor con su respectiva abundancia relativa. La clasificación se realizó mediante búsqueda de similitud de secuencias utilizando la base de datos EzTaxon.

En rojo aparecen las OTUs con los valores más altos de abundancia relativa en cada reactor, seguido de color naranja para valores medios, amarillo para valores muy pequeños y verde para cero. Todos los miembros pertenecientes a la clasificación han sido reportados o asociados a bacterias filamentosas. Se puede apreciar que la OTU 177 fue la más abundante (21,7%) en el reactor RH y que presentó similitud de secuencia con el orden *Ardenticatenales* dentro del filo *Chloroflexi*. Para este mismo reactor, la OTU 1299 (3,9%) también se encontró en abundancia seguida de la OTU 1507 (1,5%), ambas pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*.

Con respecto al reactor MO, las OTUs más abundantes fueron la 331 (10,2%), 1963 (8,9%), seguido de la 2001 (2,4%), 660 (1,6) y la 3623 (1,5%). Presentaron similitud de secuencia con *Thiothrix unzii*, *Curvibacter*, *Thiothrix caldifontis*, Tipo 0803 (filo *Chloroflexi*) y *Trichococcus* respectivamente. Por otra parte, en BA las más abundantes fueron las OTUs 4304 (2,5%) y 1839 (2,3%), seguido de 960 (1,2%), correspondientes a *Caldilineaceae*, *Saprospiraceae* y *Litorilinea*. La familia *Caldilineaceae* y el género *Litorilinea* pertenecen al filo *Chloroflexi*.

### 3.4 Análisis filogenético

Se analizaron las relaciones filogenéticas de las OTUs más abundantes correspondientes a los organismos filamentosos candidatos, basado en la secuencias del gen del ARNr 16S. Las OTUs fueron comparadas con secuencias obtenidas de la base de datos EzTaxon. A partir de estos resultados se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético (**Figura 20**).



**Figura 20.** Árbol filogenético que muestra la similitud entre las secuencias de las OTUs de posibles bacterias filamentosas y organismos relacionados. Su construcción se realizó en base a la comparación de secuencias de ADN de alta similitud utilizando el programa MEGA 7. Se utilizó neighbour-joining method. Bootstrap 1000.

Las posibles bacterias filamentosas se distribuyen a nivel de diferentes filos, las cuales corresponden a *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* y *Chloroflexi*. Junto con las OTUs se pueden observar organismos provenientes de cultivos puros y también secuencias obtenidas de clones, los cuales comparten secuencias de ADN con alto grado de similitud. Puede observarse que la OTU 177 en el cluster de *Chloroflexi* no agrupa con ninguna cepa aislada.

## 4. DISCUSIÓN

Durante este trabajo se llevó a cabo la caracterización de bacterias filamentosas presentes en sistemas de lodos activados pertenecientes a tres industrias diferentes. Esto se realizó principalmente a través la observación al microscopio óptico, la técnica de FISH y secuenciación masiva del gen del ARNr 16S. En la observación al microscopio óptico de frescos además de las características de las bacterias filamentosas se observaron las estructuras floculares y los protozoarios. Los resultados mostraron que los tres reactores presentaban diferencias en las características microscópicas (bacterias filamentosas, flóculos y protozoarios) y macroscópicas (color y sedimentación), y en sus comunidades microbianas. Los análisis microbiológicos de los sistemas de lodos activados son de gran utilidad para evitar o corregir los problemas que surgan en ellos.

### 4.1 Diversidad de bacterias filamentosas en lodos activados alimentados con efluentes industriales en nuestro país

Todos los métodos utilizados, revelaron que las bacterias filamentosas presentes en los sistemas de tratamiento de efluentes son diferentes. En esta parte de la discusión nos centraremos en los resultados obtenidos por secuenciación masiva debido a que nos brindan una identificación más profunda.

Los resultados de secuenciación masiva indicaron que los filos más abundantes fueron *Proteobacteria* en MO y RH, *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* en BA, y *Chloroflexi* en RH. Estos filos han sido reportados como dominantes en sistemas de lodos activados y para cada uno, su presencia y abundancia depende de las características de las aguas residuales, las condiciones operativas e incluso la ubicación geográfica de los reactores (Purohit *et al.*, 2016). Sin embargo, las bacterias filamentosas que están asociadas al bulking pertenecen a filos como *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* entre otros, y no a *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia*. *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* son filos que no han sido bien descritos en estos sistemas hasta el momento (Zhang *et al.*, 2012).

La clasificación filogenética realizada mediante la base de datos SILVA (Release 128) utilizando la plataforma QIIME, mostró que varias de las OTUs predominantes en los reactores correspondían a grupos taxonómicos relacionados con bacterias filamentosas (**Tabla 13**). Las principales fueron: la OTU 331 en MO (*Gammaproteobacteria*), a la que se pudo asignar el género (*Thiothrix*), la 177 en RH y la 4304 en BA, ambas relacionadas al filo *Chloroflexi*, fueron las de mayor proporción en sus respectivos reactores. Entre otras bacterias más comunes que causan bulking filamentoso pertenecen a estos grupos taxonómicos (Nielsen *et al.*, 2009).

Posteriormente, mediante la comparación de secuencias de las OTUs predominantes con la base de datos EzTaxon y búsqueda bibliográfica, se encontraron más filamentosas candidatas y grupos relacionados (**Tabla 14**).

De acuerdo al árbol filogenético, en muestras de MO, la OTU 331 mostró similitud de secuencia con la especie *Thiothrix unzii*, la 3623 con *Thiothrix caldifontis*, 660 con *Nostocoida limicola* I y la OTU 2001 con el morfotipo 0803. En BA la OTU 1839 presentó similitud con *Haliscomenobacter hydrossis* y en RH la 1299 con *Alysiosphaera europaea*. Por otra parte, la OTU 177 presentó un 95,11% de similitud de secuencia con *Ardenticatena maritima* (*Ardenticatena*). Este organismo es filamentosos pero no es habitual que esté presente en sistemas de lodos activados (Kawaichi *et al.*, 2013). Pertenece a la clase *Ardenticatenia*, la cual recientemente se ha correlacionado con el morfotipo 0092 (McIlroy *et al.*, 2016). Si bien en el árbol filogenético la OTU 177 no presenta similitud con este organismo, sí se encuentra relacionado con el orden *Ardenticatena*.

La OTU 1299 (*Candidatus Alysiosphaera europaea*), la cual le sigue en abundancia a la 177 en RH, pertenece al filo *Alphaproteobacteria*. Este subfilo es comúnmente encontrado en aguas residuales industriales. Se ha observado en algunos estudios que este organismo prolifera cuando el afluente presenta una alta relación de DQO:N/P, es decir en condiciones limitantes de nutrientes (McIlroy *et al.*, 2011).

En BA, *Haliscomenobacter hydrossis* es uno de los organismos candidato a ser predominante en dicho reactor. Esta bacteria filamentosa ha sido detectada en sistemas de lodos activados en todo el mundo y tanto en aguas residuales industriales como municipales. (Kragelund et al 2008). Algunos de los factores principales de estos sistemas que pueden contribuir a la proliferación de *H. hydrossis* son el OD, la relación F/M, la fuente de nitrógeno y la edad del lodo. Se detectó una alta correlación entre la abundancia de *H. hydrossis* y la presencia de nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N), favoreciendo su crecimiento en presencia de este compuesto.

En este mismo reactor las OTUs más abundantes restantes (4304 y 960) pertenecen al filo *Chloroflexi*. La clase *Ardenticatenales*, la familia *Caldilineaceae* (Tipo 0803), y el género *Litorilinea* corresponden al filo *Chloroflexi*, el cual es encontrado en diferentes ambientes tales como en aguas termales, ambientes hiper salinos, como así también en sistemas de lodos activados en plantas de tratamiento aguas residuales y en sistemas de tratamiento de aguas residuales de diferentes industrias (Kragelund et al., 2007) No se han descubierto condiciones particulares en las aguas residuales industriales que favorezcan su crecimiento (Figuroa et al., 2014). Sí se ha detectado que algunos miembros del filo *Chloroflexi* son abundantes en sistemas anaeróbicos-anoxicos aeróbicos, también presentes en sistemas con alto tiempo de retención de sólidos (SRT) y es posible que crezcan hidrolizando sustratos particulados (Marins et al., 2004). Estudios indican que la abundancia relativa de este filo presenta una correlación positiva con la edad del lodo, se encuentra en mayor cantidad para una edad de lodo avanzada en plantas de tratamientos con remoción de nutrientes (Miłobędzka et al., 2016). La edad del lodo no pudo relacionarse con la presencia de *Chloroflexi* en los reactores debido a que no contamos con ese parámetro.

Con respecto al reactor de MO, los resultados sugieren que *Thiothrix unzii* podría ser la filamentosa dominante seguida de *Curvibacter* y en menor proporción *Thiothrix caldifontis*. Los miembros de *Thiothrix* spp son oxidantes de azufre y se caracterizan por almacenar azufre en forma de gránulos. Se encuentran comunmente en plantas de tratamiento de aguas residuales con sistemas de lodos activados y algunos miembros en particular pueden presentar el morfotipo

021 N (Aruga *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2000). Su crecimiento en sistemas de lodos activados es promovido por aguas residuales con altas concentraciones de sulfuro y de ácidos grasos de bajo peso molecular, alta tasa de carga orgánica, baja concentración de OD y déficit de nutrientes (Asvapathanagul y Olson, 2015; Henriet *et al.*, 2017). Estos parámetros pertenecientes a MO, BA y RH no pudieron ser considerados debido a que no se encontraban disponibles.

#### **4.2 Problemas causados y control de las poblaciones de bacterias filamentosas detectadas**

Especies del género *Thiothrix* han sido reportadas como causante de graves problemas de bulking en aguas residuales industriales y a veces también de espumas (Nielsen *et al.*, 2000). Algunos métodos específicos empleados para controlar el crecimiento de *Thiothrix* son: la inclusión de una etapa de eliminación de nitrógeno y/o la utilización de un selector anaerobio (que ofrezca nitrato o nitrito como aceptor de electrones), la adición de nutrientes, la eliminación de concentración de sulfuro y de ácidos orgánicos del afluente (Martins *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2009). Por otra parte, Asvapathanagul y Olson (2015) propusieron la técnica de qPCR como diagnóstico temprano del bulking, con el fin de tomar medidas a tiempo como la cloración temprana.

Otros organismos filamentosos asociados a episodios de bulking en lodos activados son los pertenecientes al filo *Chloroflexi*. Los miembros filamentosos de este filo son capaces de hidrolizar y degradar polisacáridos y proteínas, sustratos difíciles de eliminar del afluente, por lo cual se dificulta su control mediante medidas operacionales o por cambios en el diseño del sistema (Nielsen *et al.* 2009). Como consecuencia, no se han establecido métodos de control eficientes para prevenir la proliferación de *Chloroflexi*. Sin embargo, se pueden aplicar ciertas medidas de control que son recomendables para controlar algunos miembros de este filo como son los tipos 0092, 0041 y 0675. Algunas de ellas son: remover el sustrato de partículas utilizando un skimmer, mantener una alta concentración de OD (1,5 mg/L O<sub>2</sub>) y una baja concentración de amonio (< 1 mg/L N) (Martins *et al.* 2004). También se ha sugerido que los lodos con edades avanzadas podrían reducir su crecimiento debido a la presencia de una mayor

proporción de biomasa y menor cantidad de sustratos particulados en el sistema, sin embargo no hay pruebas concretas de este efecto (Wanner, 1994).

Con respecto a *Ca. Alysiosphaera europaea*, su presencia se encuentra relacionada con fenómenos de bulking. Presenta similitud morfológica con *Nostocoida limicola* y tipo 021N por lo cual cuando se emplea microscopía es necesario realizar la técnica de FISH para lograr su identificación (Kragelund *et al.*, 2006).

Se ha reportado alta abundancia de *Ca. Alysiosphaera europaea* en lodos activados que presentan afluentes con déficit de nutrientes (Levantesi *et al.* 2004). Este organismo es capaz de utilizar varios sustratos, lo que le proporciona mayor versitilidad. Sin embargo, se ha observado una disminución en la captación de sustratos cuando utiliza nitrito como aceptor terminal de electrones en condiciones anaeróbicas. En base a esto, la introducción de un selector anaerobio con adición de nitratos y nitritos en el sistema de tratamiento podría controlar el crecimiento de *A. europaea*. (Kragelund *et al.*, 2006).

*Haliscomenobacter hydroxsis* ha sido reportada como una de las filamentosas causante de bulking en el mundo. Su crecimiento parece estar favorecido por la presencia de nitrógeno amoniacal, la relación de sustrato/crecimiento podría ser utilizada como método efectivo para controlar su proliferación. Aún no se han establecido medidas de control específicas para limitar su crecimiento (Cao y Lou, 2014; Cao y Lou, 2015).

#### **4.3 Rol de *Chloroflexi* en lodos activados**

Mediante la técnica de FISH se logró detectar y cuantificar las filamentosas del filo *Chloroflexi* en los tres reactores a través del tiempo, como también distinguir morfologías y disposición con respecto a los flóculos. En la **Tabla 10** se muestran las abundancias estimadas para cada fecha y reactor. Se puede apreciar que en general la abundancia del filo *Chloroflexi* fue mayor y constante durante el transcurso de los meses para RH, pero no así para MO y BA. La diferencia de abundancia de filamentosas del filo *Chloroflexi* que presentaron los tres

reactores podría estar sujeta a los sustratos particulares de los afluentes que presenta cada industria. Esta relación no pudo ser considerada debido a que no se disponía de la información sobre los tipos de sustratos que ingresaban a cada reactor. Por otra parte, la variación de abundancia de filamentosas *Chloroflexi* de un mes a otro en MO y BA puede estar asociada a cambios en los componentes de los afluentes, en los parámetros y medidas operacionales del sistema. Para poder relacionar la abundancia de estos organismos con los factores que condicionan su crecimiento necesario realizar un análisis de correlación entre ambos.

Con respecto a las morfologías encontradas, se pudieron detectar diferentes tipos de filamentosas del filo *Chloroflexi* en los tres reactores (**Tabla 11**). Se observaron bacterias filamentosas sobre los flóculos como en el espacio interflocular. Sin embargo, la gran mayoría de estas filamentosas se encontraron sobre los flóculos. Esto coincide con estudios que indican que debido a su disposición intraflocular como «columna vertebral» y por su abundancia relativa, las filamentosas del filo *Chloroflexi* podrían cumplir una función estructural estabilizadora brindando sostén y resistencia a los flóculos (Björnsson *et al.*, 2002). Morfotipos como el 0803 y el 0092 se ubican en los bordes de los flóculos y en el espacio interflocular, pero su sobrecrecimiento pueden «abrir» los flóculos, causando una disminución en la sedimentación del lodo (Kragelund *et al.*, 2011). Por otra parte, FISH también permitió observar características morfológicas diagnósticas como por ejemplo, crecimiento epifítico. Las filamentosas que hibridaron con la sonda y que además presentaron esta característica podrían tratarse del morfotipo 0041. Esta particularidad fue detectada en las muestras de RH.

Mediante secuenciación masiva también se detectó la presencia del filo *Chloroflexi* en los tres reactores (**Figura 15**), RH fue el que presentó mayor abundancia relativa de este filo. Estos resultados coinciden con la alta abundancia de este filo detectado por FISH en RH. A su vez, la asignación taxonómica indica que la OTU predominante en dicho reactor (177) también corresponde al filo *Chloroflexi*.

Los miembros asociados por comparación de secuencia, *Caldilineaceae* (familia) y morfotipo 0803, y *Litorilinea*, también pertenecen al filo *Chloroflexi*. Yoon *et al.*, 2010 sugieren que las bacterias filamentosas de la clase *Caldilineae* son las que forman parte de las estructuras floculares. Las OTUs encontradas en abundancia que presentaron similitud de secuencia con *Caldilineae* podrían estar cumpliendo una función estructural en los flóculos. Por otra parte, podrían tratarse de las mismas filamentosas intrafloculares observadas por FISH en las muestras de MO y BA. Sin embargo, bacterias filamentosas que pertenecen a esta clase como por ejemplo uno de los morfotipo 0803, se encuentran asociados a problemas de bulking cuando su crecimiento es excesivo. Este morfotipo se encuentra en al menos a dos filos diferentes, *Chloroflexi* y *Betaproteobacteria*, e incluso dentro del filo *Chloroflexi*, pertenece a dos clases diferentes; *Anaerolineae* y *Caldilineae* (Speirs *et al.*, 2015). Por lo tanto, para lograr la identificación de estos organismos mediante microscopía es necesario realizar FISH utilizando sondas específicas, ya que con las técnicas convencionales de tinción no es posible discernir estas diferencias.

Para poder detectar que especies de *Chloroflexi* están presentes en los reactores, y en particular cuáles son las que sobresalen de los floculos, sería conveniente utilizar sondas específicas dirigidas hacia estos organismos. De este modo, se podrían tomar medidas más específicas para su control o para evitar futuros problemas de proliferación.

#### **4.4 FISH como método de monitoreo de filamentosas en lodos activados**

La técnica de FISH permite la visualización, identificación, localización y cuantificación de células microbianas individuales. Presenta como ventaja que además de la detección de microorganismos cultivables *in situ* también es aplicable a muestras con comunidades microbianas complejas (Moter y Gobel, 2002).

En los sistemas de lodos activados, la técnica de FISH es una herramienta útil ya que permite detectar y cuantificar diferentes bacterias filamentosas presentes dependiendo de la sonda que se utilice. Durante los fenómenos de bulking, es

una técnica adecuada para caracterizar las bacterias filamentosas predominantes. Esto es muy importante debido a que es el primer paso para investigar qué factores del medio podrían estar asociados a su proliferación, con el fin de buscar medidas tanto de control como preventivas. Debido a la utilización de sondas de ADN dirigidas específicamente a diferentes grupos taxonómicos, permite discernir diferentes tipos de bacterias filamentosas, incluso con igual morfotipo, lo cual no es posible realizar con microscopía convencional. Además, la búsqueda y el desarrollo de nuevas sondas dirigidas hacia especies filamentosas han facilitado en gran medida su identificación en los sistemas de lodos activados. Otra ventaja de FISH es que se puede apreciar la morfología y disposición de las bacterias filamentosas con respecto a los flóculos. Con las técnicas de tinción convencionales es muy difícil poder observar los tipos de bacterias filamentosas que se encuentran presentes en los flóculos.

FISH ha demostrado ser una herramienta práctica, rápida y poco costosa que brinda información sobre la morfología y disposición de las filamentosas con respecto a los flóculos. Estas características son difíciles de obtener con otras técnicas, como por ejemplo con tinción y microscopía óptica. Como desventaja, esta técnica requiere un microscopio de epifluorescencia o uno de microscopía de laser confocal, los cuales son equipos muy costosos y las industrias y muchos grupos de investigación no cuentan con estos aparatos. Pero por otro lado, la realización de la técnica de FISH no es costosa y en cuestión de horas se puede obtener información sobre qué organismos filamentosos se encuentran en el sistema. En particular, en este trabajo FISH aportó información relevante sobre la abundancia, morfología y disposición de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi* en los tres reactores. Fue útil para generar nuevos datos relacionados con los sistemas de lodos activados pertenecientes a industrias de nuestro país, de los cuales no existían registros. La incorporación de más sondas específicas para otras bacterias filamentosas, como por ejemplo *Thiothrix* o *Ca. Alysiosphaera europaea* junto con el aporte adicional de los datos operacionales de los tres sistemas, hubieran brindando más información sobre las condiciones del medio de crecimiento asociados a presencia de las filamentosas más abundantes.

## 5. CONCLUSIONES

Los tres reactores presentaron diferencias en sus características microscópicas tales como morfología y abundancia de bacterias filamentosas, estructuras floculares y protozoarios. Las comunidades bacterianas fueron muy diferentes entre los tres sistemas y además, las OTUs predominantes encontradas en cada reactor fueron diferentes entre los reactores. Estas diferencias pueden estar relacionadas a la diversidad de sustratos que ingresan a cada reactor debido a que pertenecen a industrias de diferentes rubros.

La técnica de FISH permitió detectar y cuantificar bacterias filamentosas pertenecientes al filo *Chloroflexi* en los tres reactores a través del tiempo. En todos ellos se observó la presencia de este filo, siendo muy abundante en RH. Asimismo, también permitió distinguir diferentes morfologías de filamentosas *Chloroflexi* y otros tipos de bacterias filamentosas no pertenecientes a este filo. Mediante la secuenciación de amplicones de genes de ARN ribosómico 16 S con ION Torrent, se logró identificar potenciales bacterias filamentosas presentes en los reactores: *Thiothrix*, tipo 0803, tipo 0041, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Nostosoida limicola* I y Ca. *Alysiosphera europaea*. Por otra parte, la OTU predominante en RH (177) presentó similitud de secuencia (95,11%) con *Ardenticatena maritima*, organismo filamentoso el cual no se encuentra comunmente en los sistemas de lodos activados. Debido a que no presentó similitud de secuencia con ningún organismo cultivado podría indicar que se trata de un organismo no reportado.

En este trabajo se estudió por primera vez en Uruguay las bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados para el tratamiento de aguas residuales industriales. La profundización de este estudio brindaría información relevante para comprender el comportamiento de estos organismos con el fin de obtener un adecuado funcionamiento en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amador, A., Veliz, E., y Bataller, M. (2015) Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones. *CENIC Ciencias Químicas* **46**:1-10.
- Amann, R. and Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 339–348.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Amann, R.L., and Ludwig, W. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation*. **59**: 143–169.
- Aonofriesei, F., Ovidius, U., and Compunds, N. (2007) Activated sludge bulking episodes and dominant filamentous bacteria at wastewater treatment plant constanta sud (Romania). *Proceedings of the Romanian Academy* **2**, 83-87.
- Asvapathanagul, P. and Olson, B.H. (2015) Identification and quantification of *Thiothrix eikelboomii* using qPCR for early detection of bulking incidents in a full-scale water reclamation plant. *Appl Microbiol Biotechnol* **99** 1-13.
- Aruga, S. Kamagata, Y. Kohno, T. Hanada, S. Nakamura, K. Kanagawa, T. (2002) Characterization of filamentous Eikelboom Type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* **52**: 1309–1316.
- Bhargava, A. (2016) Activated Sludge Treatment Process– Concept and System Design. *International Journal of Engineering Development and Research* **4**: 890–896.
- Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., and Blackall, L.L. (2002) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* **148**: 2309– 2318.
- Burger, W., Krysiak-Baltyn, K., Scales, P.J., Martin, G.J.O., Stickland, A.D., and Gras, S.L. (2017) The influence of protruding filamentous bacteria on floc stability and solid-liquid separation in the activated sludge process. *Water*

- Cao, C. and Lou, I. (2015) Analysis of environmental variables on population dynamic change of *Haliscomenobacter hydrossis*, the bulking causative filament in Macau wastewater treatment plant. *Desalination and Water Treatment* 37–41.
- Cao, C., Lou, I., Huang, C., and Lee, M.-Y. (2014) Metagenomic sequencing of activated sludge filamentous bacteria community using the Ion Torrent platform. *Desalination and Water Treatment* 57: 2175–2183.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Ceuppens, S., De Coninck, D., Botteldoorn, N., Van Nieuwerburgh, F., and Uyttendaele, M. (2017) Microbial community profiling of fresh basil and pitfalls in taxonomic assignment of enterobacterial pathogenic species based upon 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 257: 148–156.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L., and Hassell, D.G. (2009) A review on anaerobic – aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. 155: 1–18.
- Chandran, A. (2018) Overview of Next-Generation Sequencing Technologies and Its Application in Chemical Biology. In, *Advancing Development of Synthetic Gene Regulators*. Springer Singapore, pp. 1–41.
- Chen, W., Gao, X., Xu, H., Cai, Y., and Cui, J. (2017) Influence of extracellular polymeric substances (EPS) treated by combined ultrasound pretreatment and chemical re-flocculation on water treatment sludge settling performance. *Chemosphere* 170: 196–206.
- Christian, R. (2006) *Wastewater Treatment: Concepts And Design Approach*. PHI Learning Pvt. Ltd. 5: 98 - 103.
- Claesson, M.J., O’Sullivan, O., Wang, Q., Nikkila, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O’Toole, P.W., 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4 (8).

- Cubbage, L.E., Pitt, P.A., Ph, D., Stone, A.L., He, X., Ph, D., et al. (2017) Steam Application to Destroy Foam-Forming Bacteria in Activated Sludge Systems. *Journal of Environmental Engineering* **143**: 1–5.
- Curds, C., (1973) The role of protozoa in activated sludge process. *Amer. zool.*, 13:161-169
- D'Antoni, B.M., Iracà, F., and Romero, M. (2017) Filamentous foaming and bulking in activated sludge treatments : causes and mitigation actions. *Panta Rei Srl - Water Solutions*.
- Dierdonck, J. Van, Broeck, R. Van Den, Vervoort, E., D, P., Springael, D., Impe, J. Van, and Smets, I. (2012) Does a change in reactor loading rate affect activated sludge bioflocculation ? *Process Biochemistry* **47**: 2227–2233.
- Eikelboom, D.H. (1975) Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* **9**: 365–388.
- Eikelboom, D.H. (2000) Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. 156.
- Erijman, L., Figuerola, E.V.A.L.M., Guerrero, L.D., and Ayarza, J.M. (2011) Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. 127–135.
- Figuerola, M., Val del Río, A., Campos, J. L., Méndez, R., and Mosquera-Corral, A. (2015). Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38 (5), 841-851.
- Gich, F., Garcia-Gil, J., and Overmann, J. (2001) Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch Microbiol* **177**: 1–10.
- Griffiths, P. & Stratton, H. 2010 Foaming organisms in sewage treatment - friend or foe: victim of bad publicity. In: Proceedings from 35th Annual Qld Water Industry Operations Workshop. CQ University, Rock Hampton, 22–24 June.
- Guo, F., Ju, F., Cai, L., and Zhang, T. (2013) Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for

Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *PLoS ONE* **8**:

- Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Yang, X., and Yuan, Z. (2014) Filamentous and non-filamentous bulking of activated sludge encountered under nutrients limitation or deficiency conditions. *Chemical engineering journal* **255**: 453–461.
- Henriet, O., Meunier, C., Henry, P., and Mahillon, J. (2017) Filamentous bulking caused by *Thiothrix* species is efficiently controlled in full-scale wastewater treatment plants by implementing a sludge densification strategy. *Scientific Reports* **7**: 1–10.
- Hermawan, M., Bushell, G.C., Craig, V.S.J., Teoh, W.Y., and Amal, R. (2004) Floe strength characterization technique. An insight into silica aggregation. *Langmuir* **20**: 6450–6457.
- Hesham, A.E.L. (2012) Molecular genetics tools to understand foaming and bulking filamentous bacteria in wastewater treatment plants. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* **4**: xvii–xviii.
- Hossain F. 2004. Activated sludge bulking: a review of causes and control strategies. *Environmental Engineering Division* 85:1-6.
- Hreiz, R., Latifi, M.A., and Roche, N. (2015) Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art. *Chemical Engineering Journal* **281**: 900–920.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses , Perils , and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2761–2764.
- Jenkins, D., Richard, M.G. & Daigger, G.T. (1984) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Pretoria: *Water Research Commission*.
- Jenkins, D., Richard, M. G. & Daigger, G. T. (1993). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming, 2nd edn. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

- Ju, F. and Zhang, T. (2015) 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 4119–4129.
- Jern, N.G. and Wun, J., (2006). Industrial Wastewater Treatment, Imperial College Press, London, pp. 1-15.
- Kapuscinski, J. (1995) DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem* 220–233.
- Kawaichi, S., Ito, N., Kamikawa, R., Sugawara, T., Yoshida, T., and Sako, Y. (2013) *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum “Chloroflexi” isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2992–3002.
- Kragelund, C., Kong, Y., van der Waarde, J., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., et al. (2006) Ecophysiology of different filamentous Alphaproteobacteria in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology* **152**: 3003–3012.
- Kragelund, C., Remesova, Z., Nielsen, J.L., Thomsen, T.R., Eales, K., Seviour, R., et al. (2007) Ecophysiology of mycolic acid-containing Actinobacteria (Mycolata) in activated sludge foams. **61**: 174–184.
- Kragelund C, Thomsen TR, Mielczarek AT, Nielsen PH. (2011). Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 451–462.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. et al (2008). Identify, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to Bacteroidetes present in activated sludge plants. *Microbiology* **154**: 886-894.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., and Medicine, E. (2016) MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology Evolution* **33**: 1870–1874.
- Leal, C., Amaral, A.L., and Costa, M. de L. (2016) Microbial-based evaluation of foaming events in full-scale wastewater treatment plants by microscopy

- survey and quantitative image analysis. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 15638–15650.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurkink, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J., et al. (2004) Filamentous Alphaproteobacteria associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 716–727.
- Lledías, M. (2013) Identificación con técnica de FISH de bacterias filamentosas en un bioreactor de membrana de aguas residuales domésticas. Tesis de Maestría. Universidad de Valencia.
- López de Heredia, U. (2016) Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales* **64**: 7–31.
- Madoni, P., Davoli, D., and Gibin, G. (2000) Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated- sludge plants in Italy. *Water Research* **34**: 1767–1772.
- Madoni, P., 2011. Protozoa in wastewater treatment processes: a minireview. *Ital. J. Zool.* 78, 3–11.
- Martins, M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J., and Loosdrecht, M.C.M. Van (2004) Filamentous bulking sludge — a critical review. **38**: 793–817.
- Mcllroy, S.J., Karst, S.M., Nierychlo, M., Dueholm, M.S., Albertsen, M., Kirkegaard, R.H., et al. (2016) Genomic and in situ investigations of the novel uncultured Chloroflexi associated with 0092 morphotype filamentous bulking in activated sludge. *ISME Journal* **10**: 2223–2234.
- Mcilroy, S.J., Speirs, L.B.M., Tucci, J., and Seviour, R.J. (2011) In Situ Profiling of Microbial Communities in Full-Scale Aerobic Sequencing Batch Reactors Treating Winery Waste in Australia. **45**: 8794–8803.
- Milobeldzka, A., Witeska, A., and Lski, A.M. (2016) Factors affecting population of filamentous bacteria in wastewater treatment plants with nutrients removal. *Water Science and Technology* **73**: 790–797.
- Mohinudeen C., Joe M.M. Benson A., Tongmin S. (2017) An Overview of Next-Generation Sequencing (NGS) Technologies to Study the Molecular

- Diversity of Genome. In: Kalia V., Kumar P. (eds) *Microbial Applications Vol.1*. Springer, Cham.
- Moter, A. and Gobel, U.B. (2000) Fluorescence in situ hybridization ( FISH ) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Micrological Methods* **41**: 85–112.
- Ng, W.J., 2006. Industrial Wastewater Treatment. Imperial College Press.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., and Nielsen, J.L. (2009) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 969–998.
- Nielsen PH, de Muro MA & Nielsen JL (2000) Studies on the *in situ* physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **2**: 389–398.
- Orozco, A. (2005) Bioingeniería de aguas residuales, Teoría y Diseño. Acodal. 1 - 4
- Övez, S. and Orhon, D. (2005) Microbial ecology of bulking and foaming activated sludge treating tannery wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **40**: 409–422.
- Pajdak-Stós, A., Kocerba-Soroka, W., Fyda, J., Sobczyk, M., and Fiałkowska, E. (2017) Foam-forming bacteria in activated sludge effectively reduced by rotifers in laboratory- and real-scale wastewater treatment plant experiments. *Environmental Science and Pollution Research* **24**: 13004–13011.learining.
- Patwardhan, A.D. (2017). Industrial wastewater treatment. PHI Learning. 1-5
- Purohit, H.J., Kapley, A., Khardenavis, A., Qureshi, A., and Dafale, N.A. (2016) Insights in Waste Management Bioprocesses Using Genomic Tools Elsevier Ltd. *Advances in Applied Microbiology* **97**:121-170.
- Ramalho, R. (1990) Tratamiento de aguas residuales. Reverte
- Ranade, V., Bhandari, V., (2014) Industrial Wastewater Treatment, Recycling, and Reuse. Butterworth-Heinemann/Elsevier Science. Oxford, UK.

- Rodicio M, Mendoza M. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22: 238-245.
- Salehizadeh, H. and Shojaosadati, S.A. (2001) Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance. **19**: 371–385.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463–5467.
- Sanschagrín, S. and Yergeau, E. (2014) Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. *Journal of Visualized Experiments* 3–8.
- Soddell, J.A. and Seviour, R.J. (1990) Microbiology of Foaming in Activated-Sludge Plants. *Journal of Applied Bacteriology* **69**: 145–176.
- Sonune, A. and Ghate, R. (2004) Developments in wastewater treatment methods. *Desalination* **167**: 55–63.
- Sperling, M., (2007). Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal: Biological Wastewater Treatment Series Volume 1. Published by IWA Publishing. **3**:77 - 150.
- Speirs, L.B., Dyson, Z.A., Tucci, J., and Seviour, R.J. (2017) Eikelboom filamentous morphotypes 0675 and 0041 embrace members of the Chloroflexi: resolving their phylogeny, and design of fluorescence in situ hybridisation probes for their identification. *FEMS microbiology ecology* **93**: 1–13.
- Speirs, L.B., Tucci, J., Seviour, R.J., 2015. The activated sludge bulking filament Eikelboom morphotype 0803 embraces more than one member of the Chloroflexi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv100.
- Sponza, D.T. (2003) Investigation of extracellular polymer substances ( EPS ) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. **32**: 375–385.
- Tandoi, V., Jenkins, D., Wanner, J. (2017) Activated Sludge Separation Problems: Theory, Control Measures, in: Practical Experiences, IWA Publishing, segunda edición.

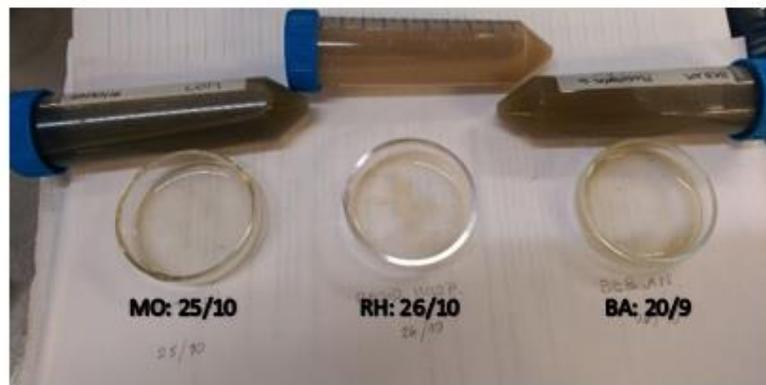
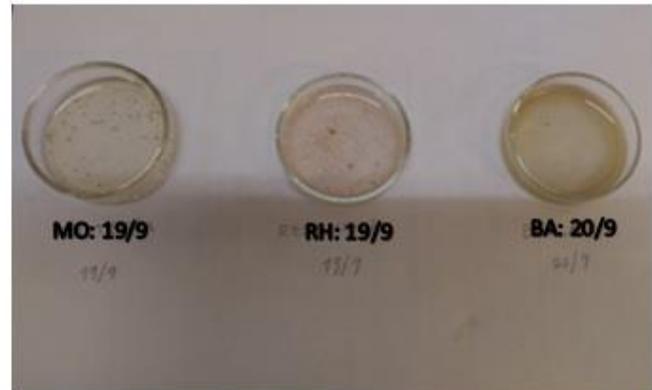
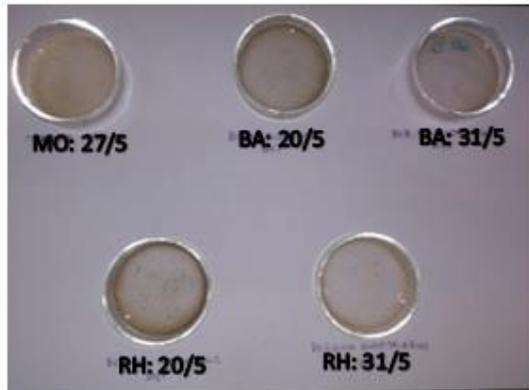
- Tansel, B. (2018) Morphology, composition and aggregation mechanisms of soft bioflocs in marine snow and activated sludge: A comparative review. *Journal of Environmental Management* **205**: 231–243.
- Tringe, S.G. and Hugenholtz, P. (2008) A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* **11**: 442–446.
- Tillman, G. (1991). Primary Treatment at Wastewater Treatment Plants. Lewis publisher, INC. 1- 4.
- Ukah, B.U., Igwe, O., and Ameh, P. (2018) The impact of industrial wastewater on the physicochemical and microbiological characteristics of groundwater in Ajao- Estate Lagos , Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment* (2018) **190**: 235.
- Wagner, M. and Haider, S. (2012) New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 96–102.
- Wang, J., Li, Q., Qi, R., Tandoi, V., and Yang, M. (2015) Sludge bulking impact on relevant bacterial populations in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Process Biochemistry* **49**: 2258–2265.
- Wanner J, Kragelund C & Nielsen PH (2010) Microbiology of bulking. *Microbial Ecology of Activated Sludge* (Seviour RJ & Nielsen PH, eds), pp. 191–215. IWA publishing, London.
- Wanner J (1994) *Activated Sludge Bulking and Foaming Control*. Technomic Publishing AG, Basel.
- Yoon, D.N., Park, S.J., Kim, S.J., Jeon, C.O., Chae, J.C., and Rhee, S.K. (2010) Isolation, characterization, and abundance of filamentous members of Caldilineae in activated sludge. *Journal of Microbiology* **48**: 275–283.
- Yuan, D. and Wang, Y. (2013) Influence of extracellular polymeric substances on rheological properties of activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* **77**: 208–213.
- Zhang, T., Shao, M.F., and Ye, L. (2012) 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal* **6**: 1137–1147.



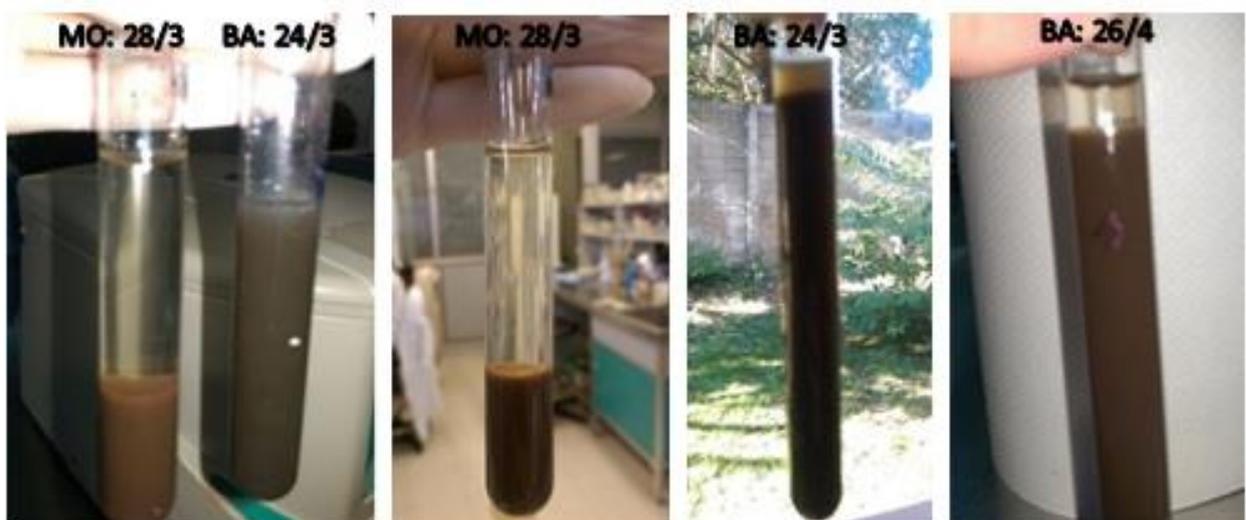
# ANEXO 1

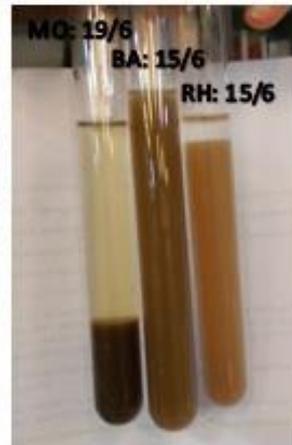
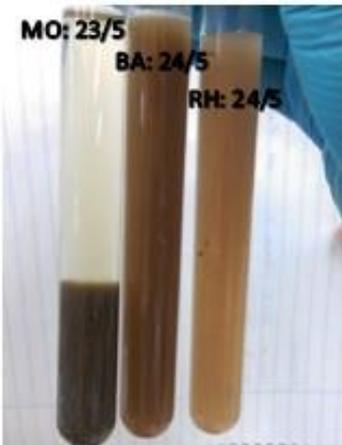
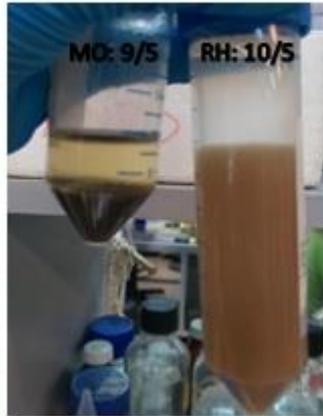
## Propiedades macroscópicas: Color y Sedimentación

Año 2016



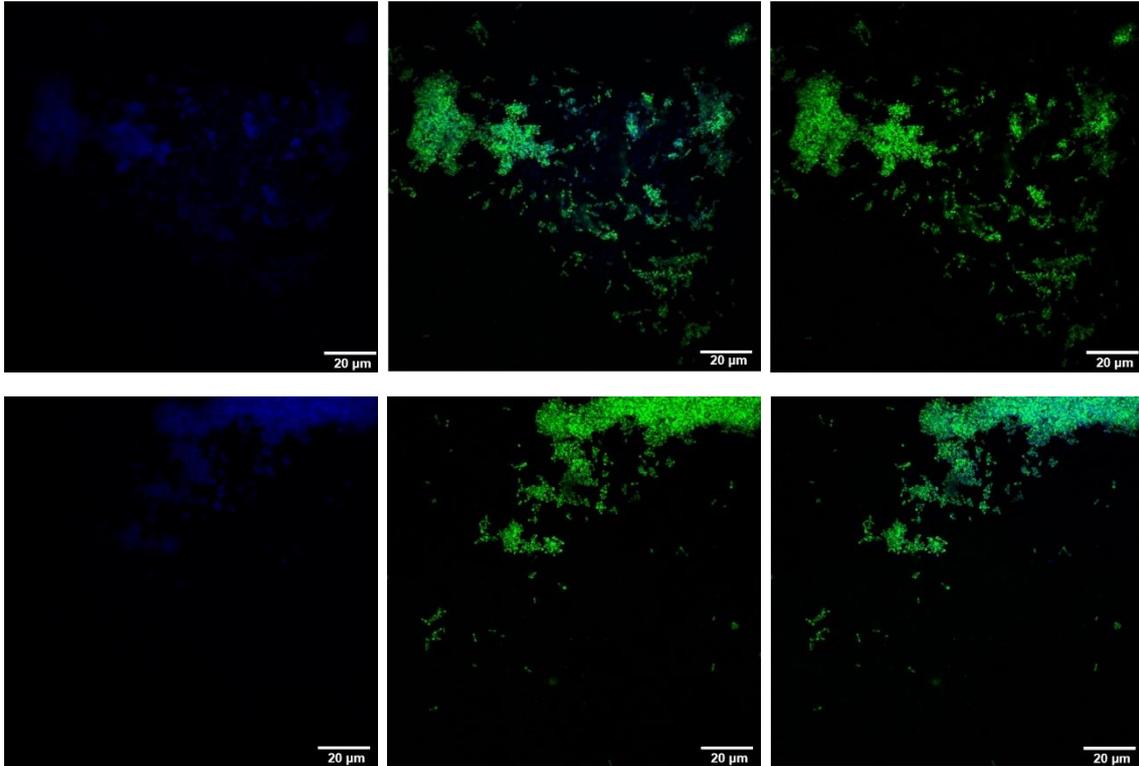
Año 2017



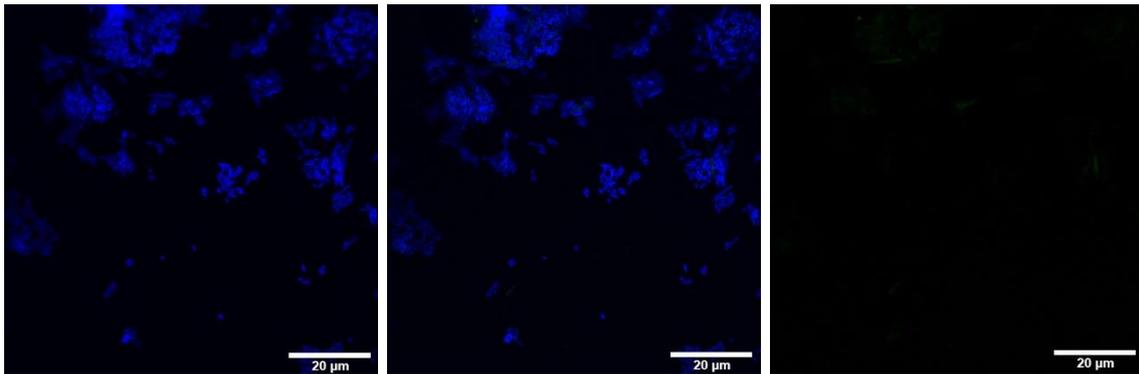


## ANEXO 2

Control positivo: Cultivo de *Sphaerobacter Thermophilus* (Filo *Chloroflexi*)



Control negativo: Cultivo de *Escherichia Coli*



## **ANEXO 3**

### **Kit de extracción de ADN PowerSoil® (PowerSoil® DNA Isolation Kit)**

#### Protocolo de Trabajo

Usar guantes en todo momento

1. Agregar 0,25 gramos de muestra de suelo a los tubos PowerBead.
  2. Agitar suavemente para mezclar.
  3. Verificar la solución C1. Si se precipita la Solución C1, calentar la solución a 60°C hasta que se disuelva.
  4. Agregar 60 µl de Solución C1 y luego invertir varias veces o agitar brevemente.
  5. 5. Asegurar los tubos PowerBead de forma horizontal en el soporte adaptador de tubos Vortex MO BIO para el vórtex (catálogo MO BIO n.º 13000-V1-24) o asegurar los tubos horizontalmente en una almohadilla vortex de cama plana con cinta adhesiva. Utilizar el Vortex a velocidad máxima durante 10 minutos.
  6. Asegurarse de que los tubos PowerBead giren libremente en la centrífuga sin frotamiento. Centrifugar los tubos a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente.
- PRECAUCIÓN:** no exceder 10,000g o los tubos pueden romperse.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml (incluido).
  8. Agregar 250 µl de solución C2 y colocar en el vortex durante 5 segundos. Incubar a 4 ° C durante 5 minutos.
  9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 g.
  10. Evitar el sedimento (pellet) y transferir hasta, pero no más de 600 µl de sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml (incluido).
  11. Agregar 200 µl de solución C3 y vortexar brevemente. Incubar a 4 ° C durante 5 minutos.

12. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.

13. Evitar el sedimento, transferir hasta, pero no más, 750 µl de sobrenadante en un tubo de recogida limpio de 2 ml (incluido).

14. Agitar para mezclar la Solución C4 antes de usar. Agregar 1200 µl de Solución C4 al sobrenadante y vortexear durante 5 segundos.

5. Colocar aproximadamente 675 µl en un filtro de centrifugación y centrifugar a 10000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Desechar el flujo y agregar 675 µl adicionales de sobrenadante al filtro de centrifugación y centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Cargar el sobrenadante restante en el filtro de centrifugación y centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se requieren un total de tres cargas por cada muestra procesada.

16. Agregue 500 µl de solución C5 y centrifugue a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g.

17. Descartar el filtrado.

18. Centrifugar nuevamente a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10,000 g.

19. Colocar con cuidado el filtro de centrifugado en un tubo de colección limpio de 2 ml (incluido). Evitar salpicaduras de cualquier solución C5 en el filtro de centrifugado.

20. Agregar 100 µl de solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco.

22. Descarta el filtro. El ADN en el tubo ahora está listo para cualquier aplicación posterior. No se requieren más pasos.

Se recomienda almacenar el ADN congelado (-20°C a -80°C). La solución C6 no contiene EDTA. Para concentrar el ADN, consultar la Guía de sugerencias y solución de problemas.

## ANEXO 4

### Amplificación por PCR

#### Materiales:

-Muestras de ADN previamente aislado

-Primers universales 520F (5-AYTGGGYDTAAAGNG-3') y 802R (TACNNGGGTATCTAATCC)

-Ranger Mix (bioline)

-H<sub>2</sub>O libre de DNAsa Sigma

-Taq polimerasa

-Ependorfs de 0,5 ml

-Hielo

#### Procedimiento:

1) En eppendorf de 0,5 ml agregar en orden los reactivos que se muestran en la siguiente tabla y mantener en hielo:

Mix de PCR para una reacción de 50µl	
Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O	19 µl
Buffer Ranger Mix (1,5 mM)	25µl
Primer 802R	1 µl
Primer 520F	1 µl
Polimerasa Taq (5 U/µl)	1 µl
ADN	3 µl

2) Las condiciones de amplificación utilizadas fueron:

Etapa del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	94	30 seg	35
Hibridación	55	30 seg	35
Extensión	72	1,3 min	35
Extensión final	72	10	

3) Como control negativo se utilizaron los mismos reactivos que las muestras pero sin ADN (3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en su lugar). Y como control positivo, se utilizó una muestra de ADN diferente (1  $\mu$ l si es concentrado + 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O)

## **ANEXO 4**

### **Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery**

#### Protocolo

Todos los pasos de centrifugación deben realizarse entre 10,000 - 16,000 x g.

1. Retirar el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí y transferirlo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Agregar 3 volúmenes de ADB a cada volumen de agarosa extraída del gel (por ejemplo, para 100 µl (mg) de gel de agarosa agregar 300 µl de ADB).
3. Incubar a 37-55 C durante 5-10 minutos hasta que la porción de gel se disuelva completamente.

Para fragmentos de ADN > 8 kb, luego del paso de incubación, agregar un volumen adicional (igual al de la porción de gel) de agua a la mezcla para una mejor recuperación del ADN (por ejemplo, 100 µl de agarosa, 300 µl de ADB y 100 µl de agua).

4. Transferir la solución de agarosa derretida a una columna Zymo-Spin™ en un tubo colector.
5. Centrifugar durante 30-60 segundos.
6. Agregar 200 µl de tampón de lavado de ADN a la columna y centrifugar durante 30 segundos. Repetir el paso de lavado.
7. Agregar ≥ 6 µl de buffer de elución del ADN directamente a la matriz de la columna. Colocarla en un tubo de 1,5 ml y centrifugar durante 30-60 segundos para eluir el ADN.

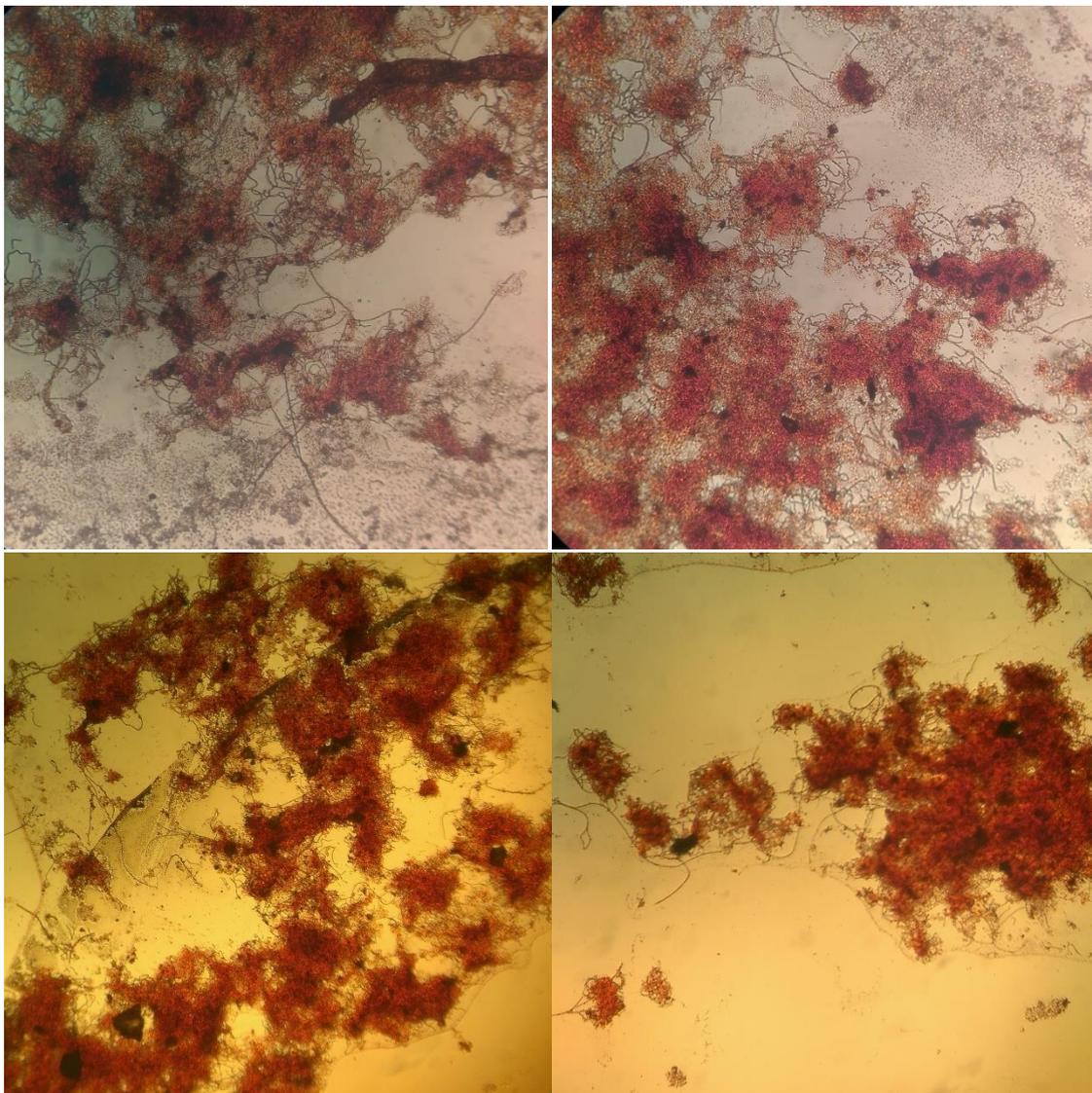
## ANEXO 6

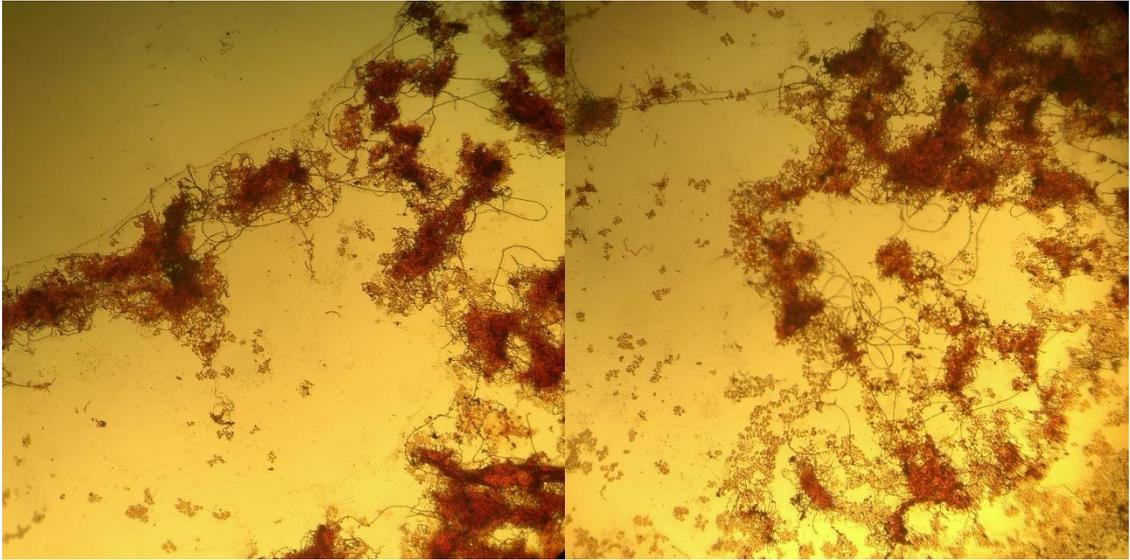
### Tinción Gram

Residuos Hospitalarios:

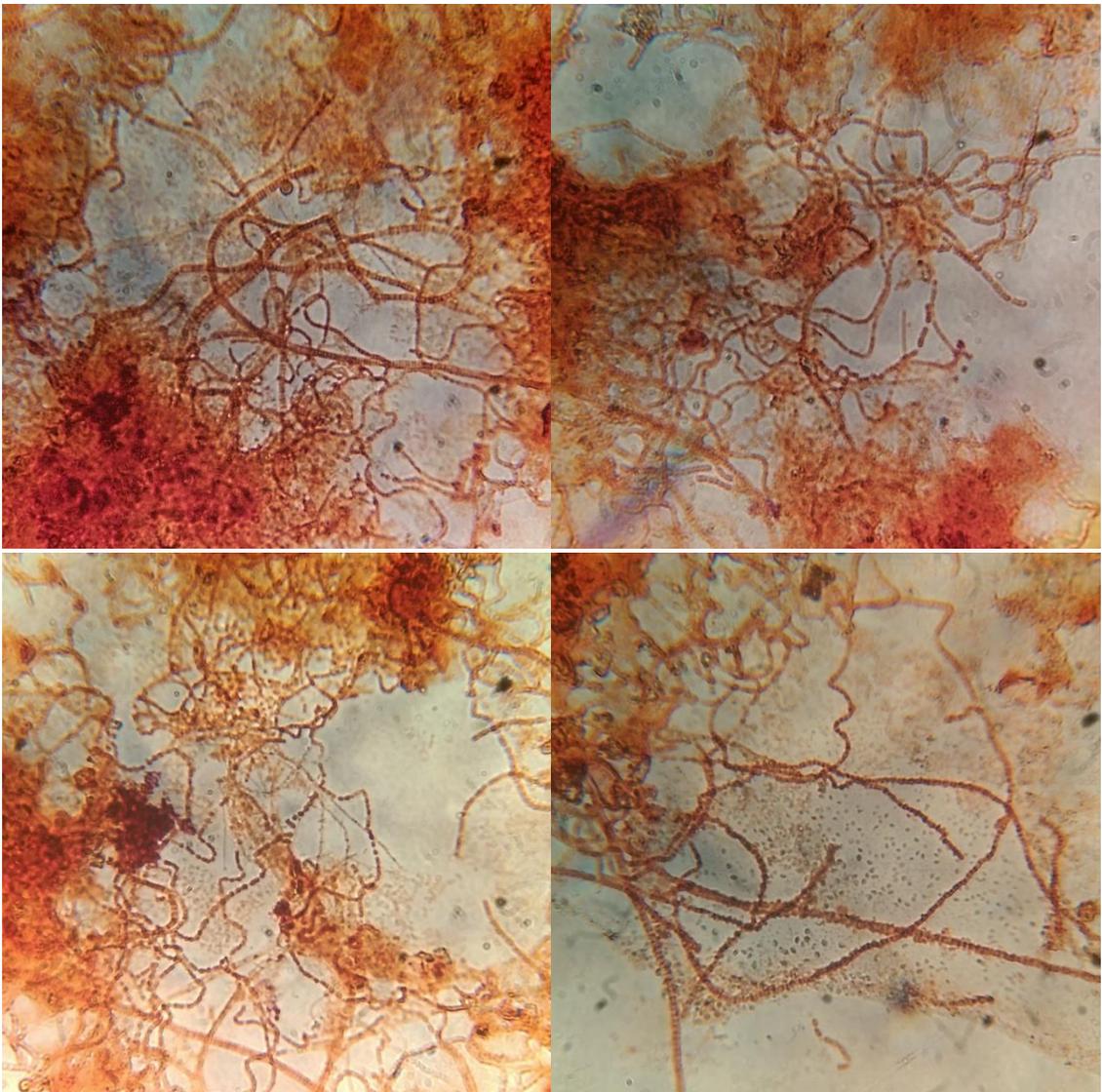
Fecha: 9-5-2017

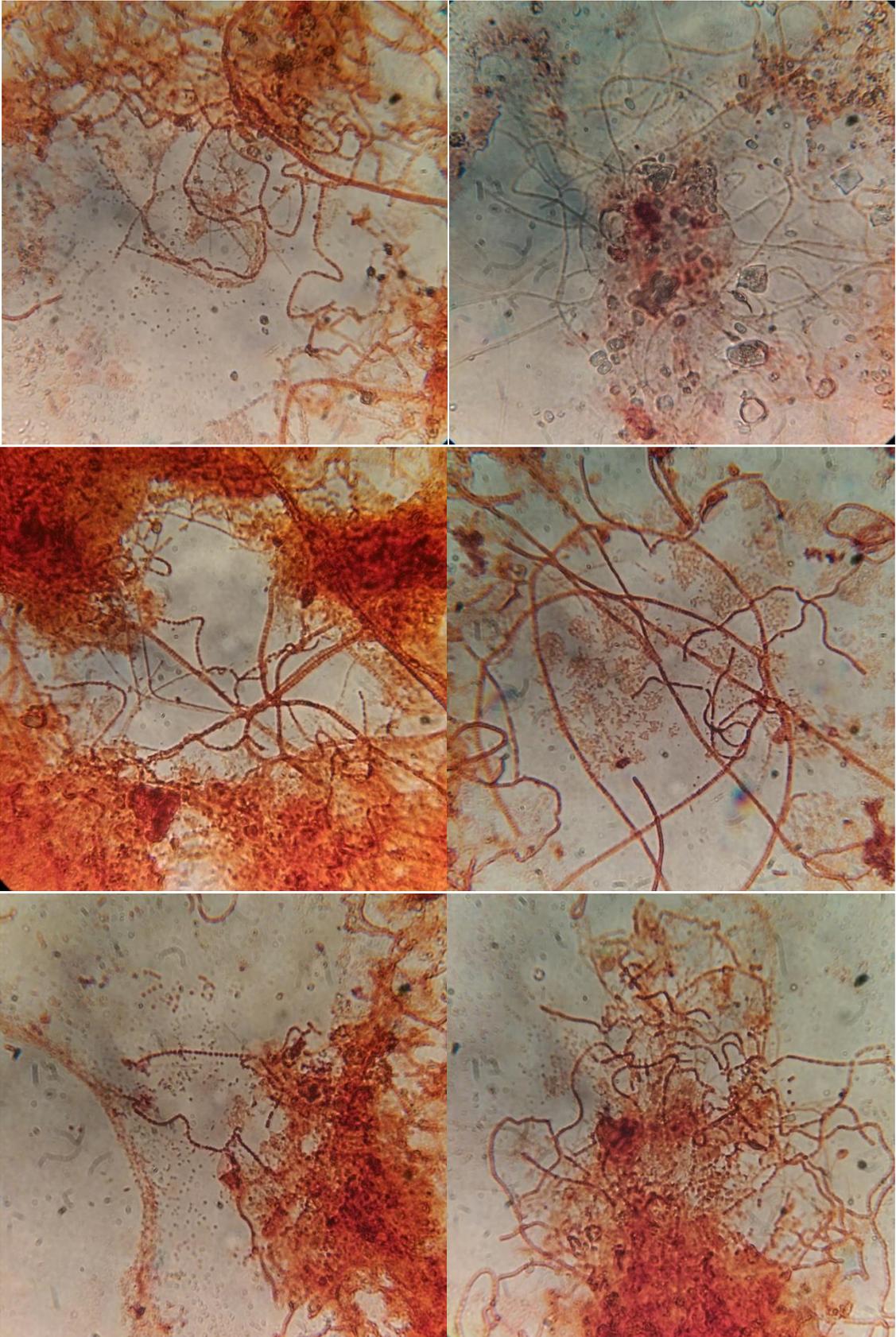
Aumento: 40X

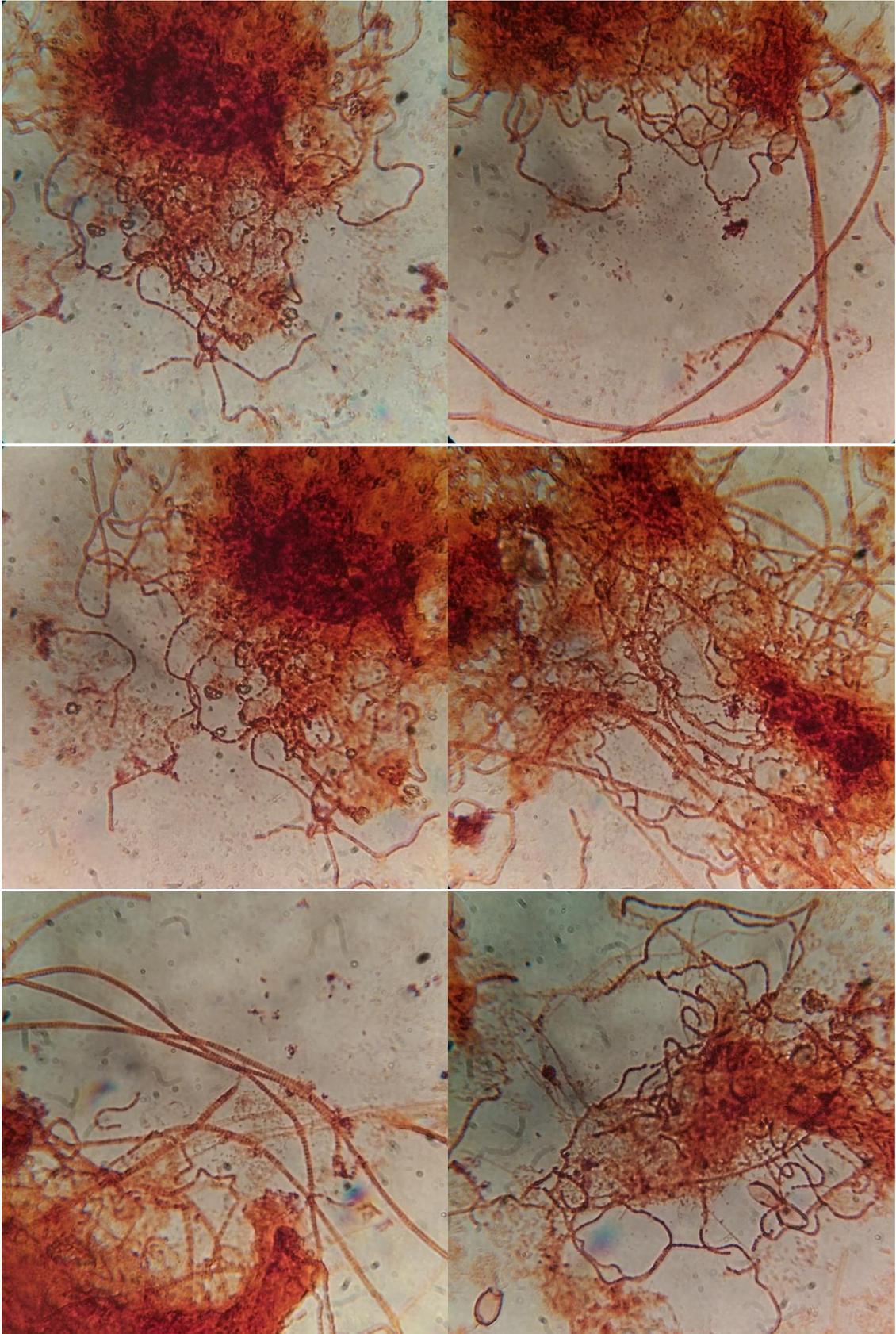


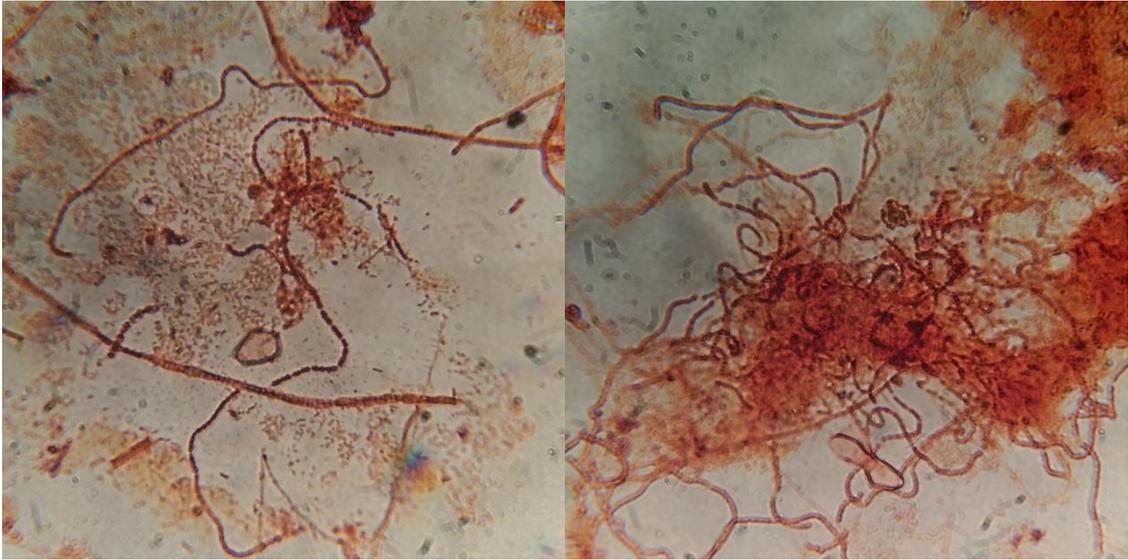


Aumento: 100X



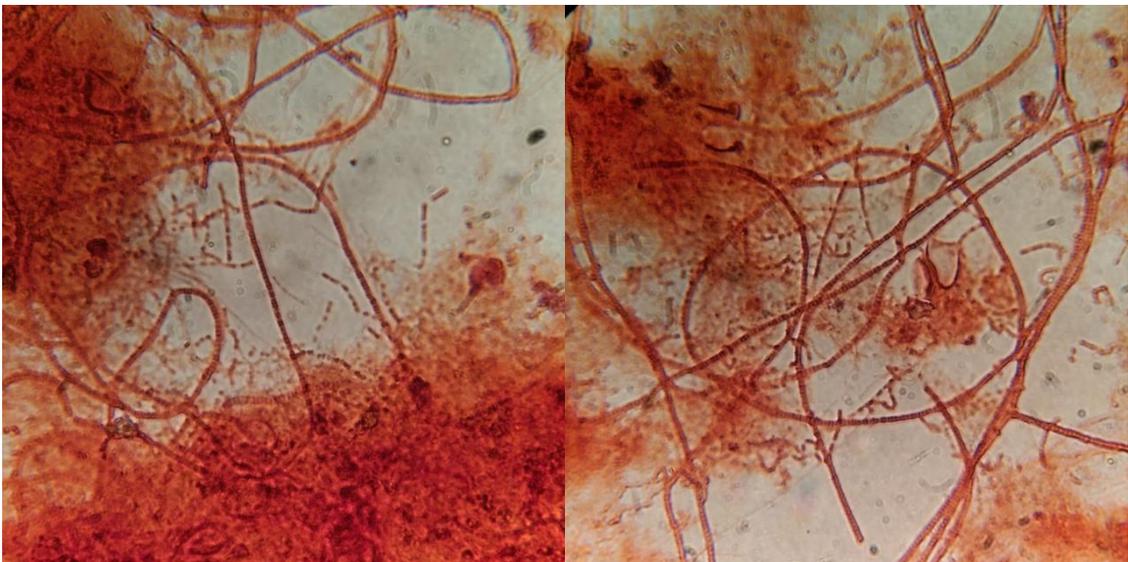


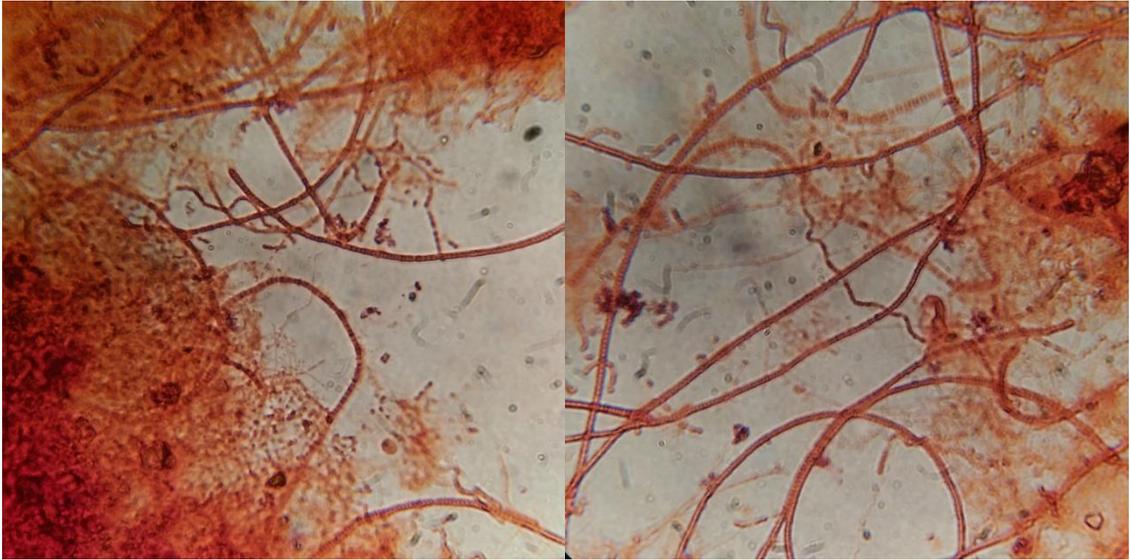


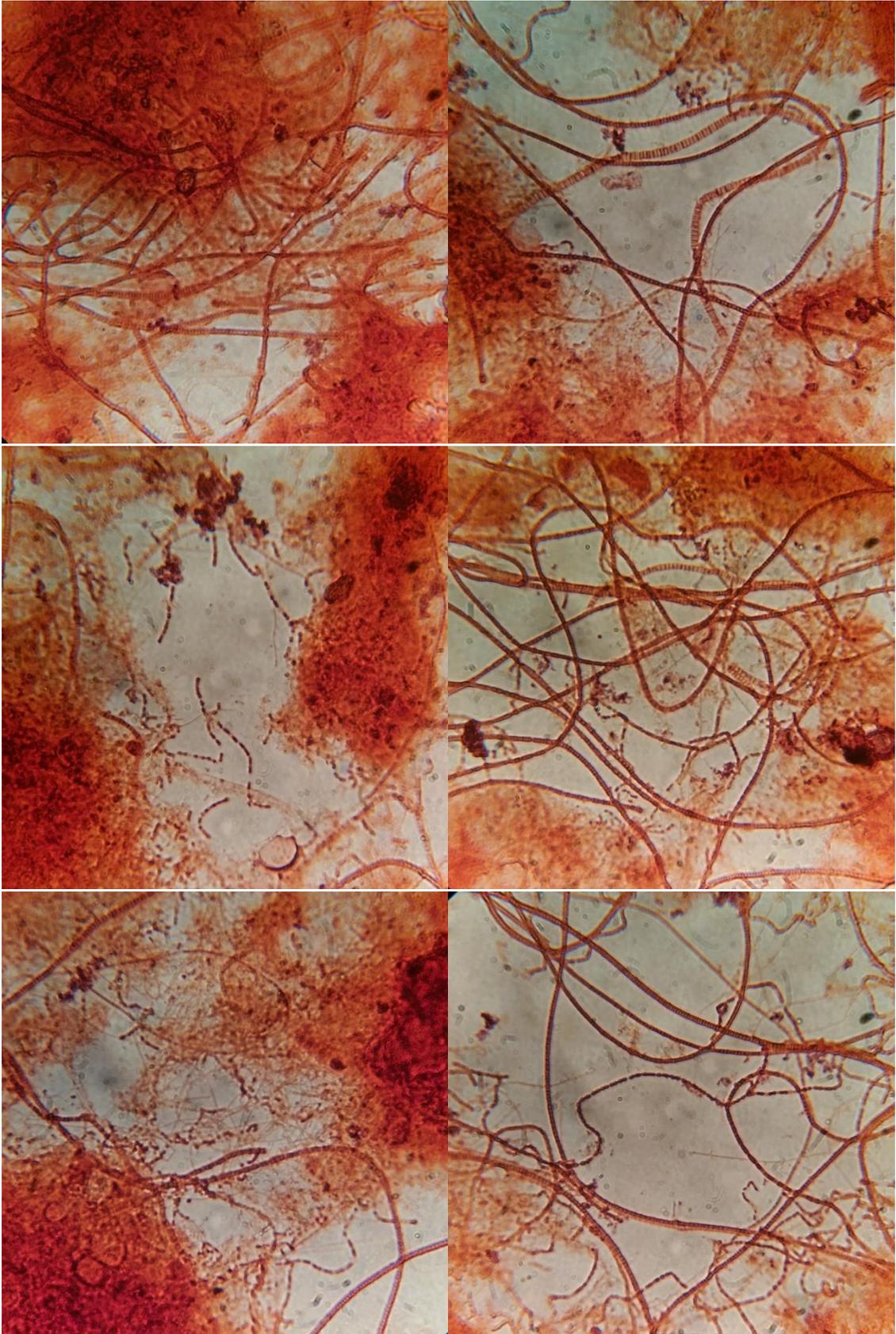


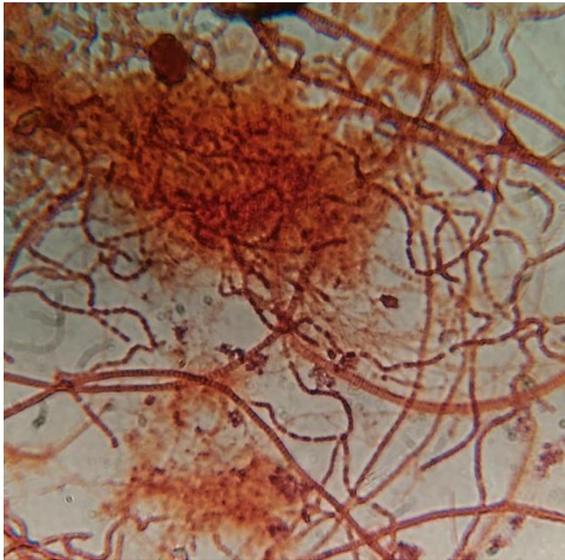
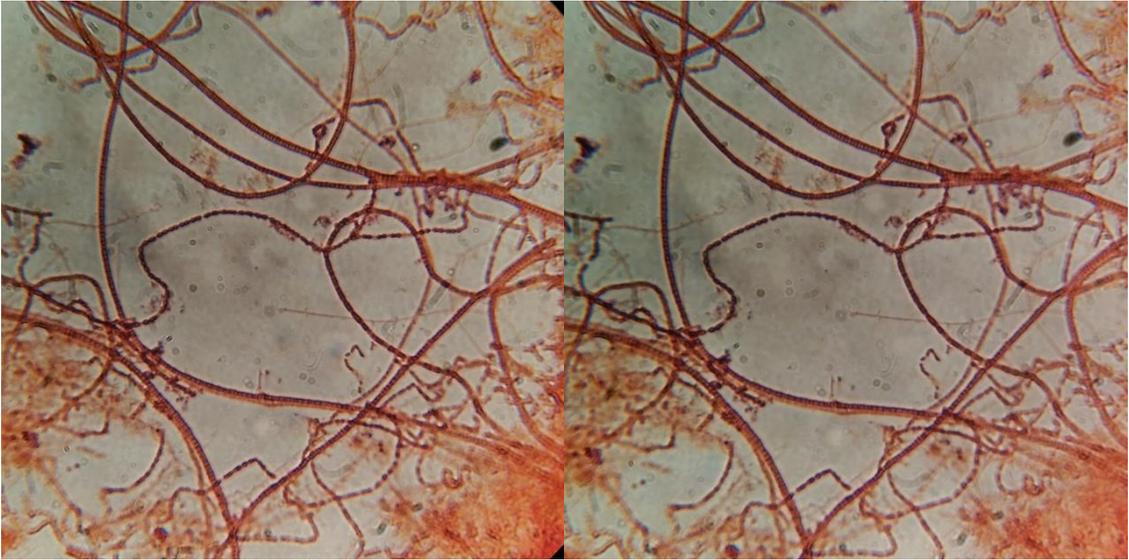
Fecha: 24-5-2017

Aumento 100X







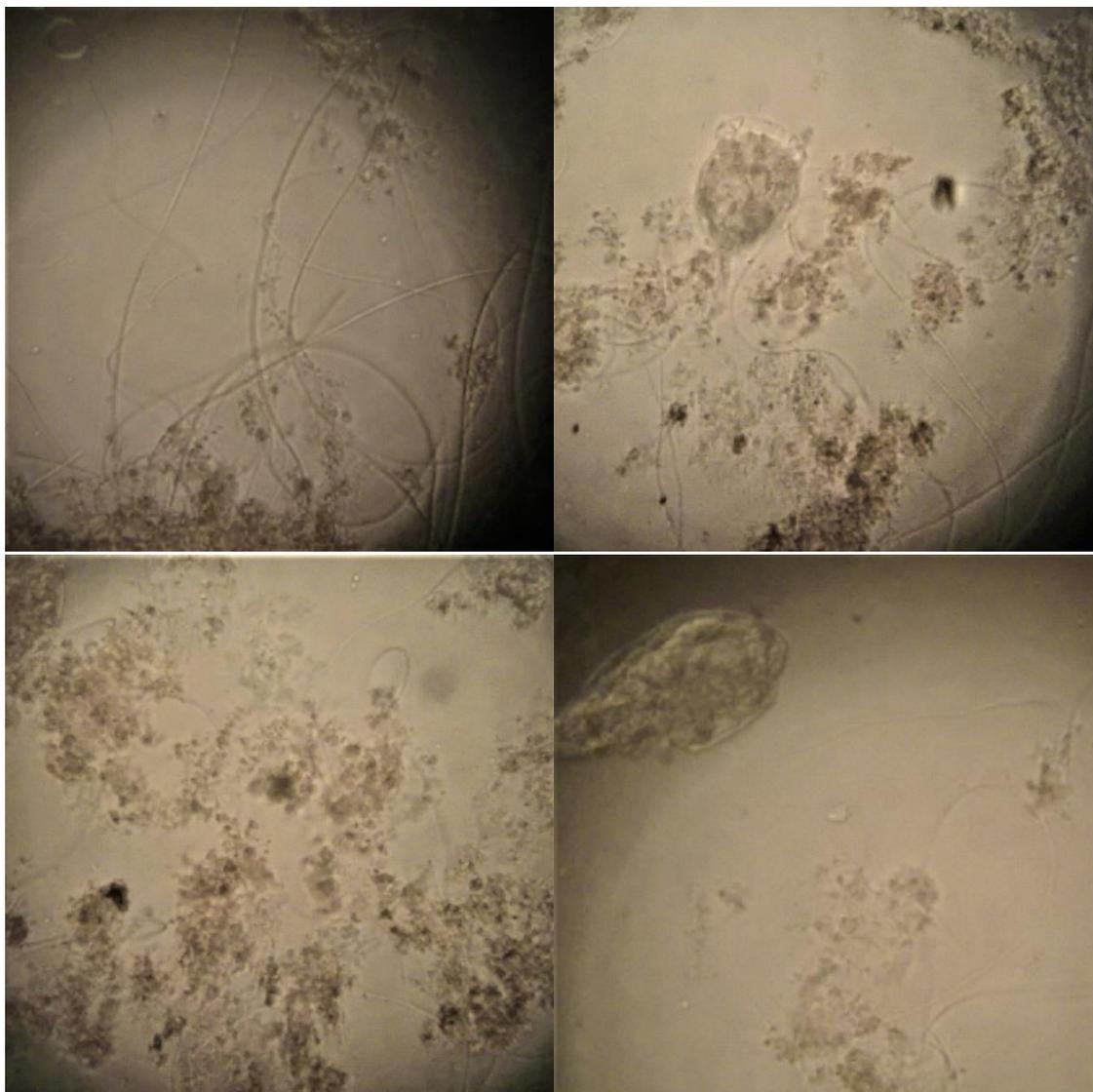


## ANEXO 7

### MALTERÍA

Fecha: 27-5-2016

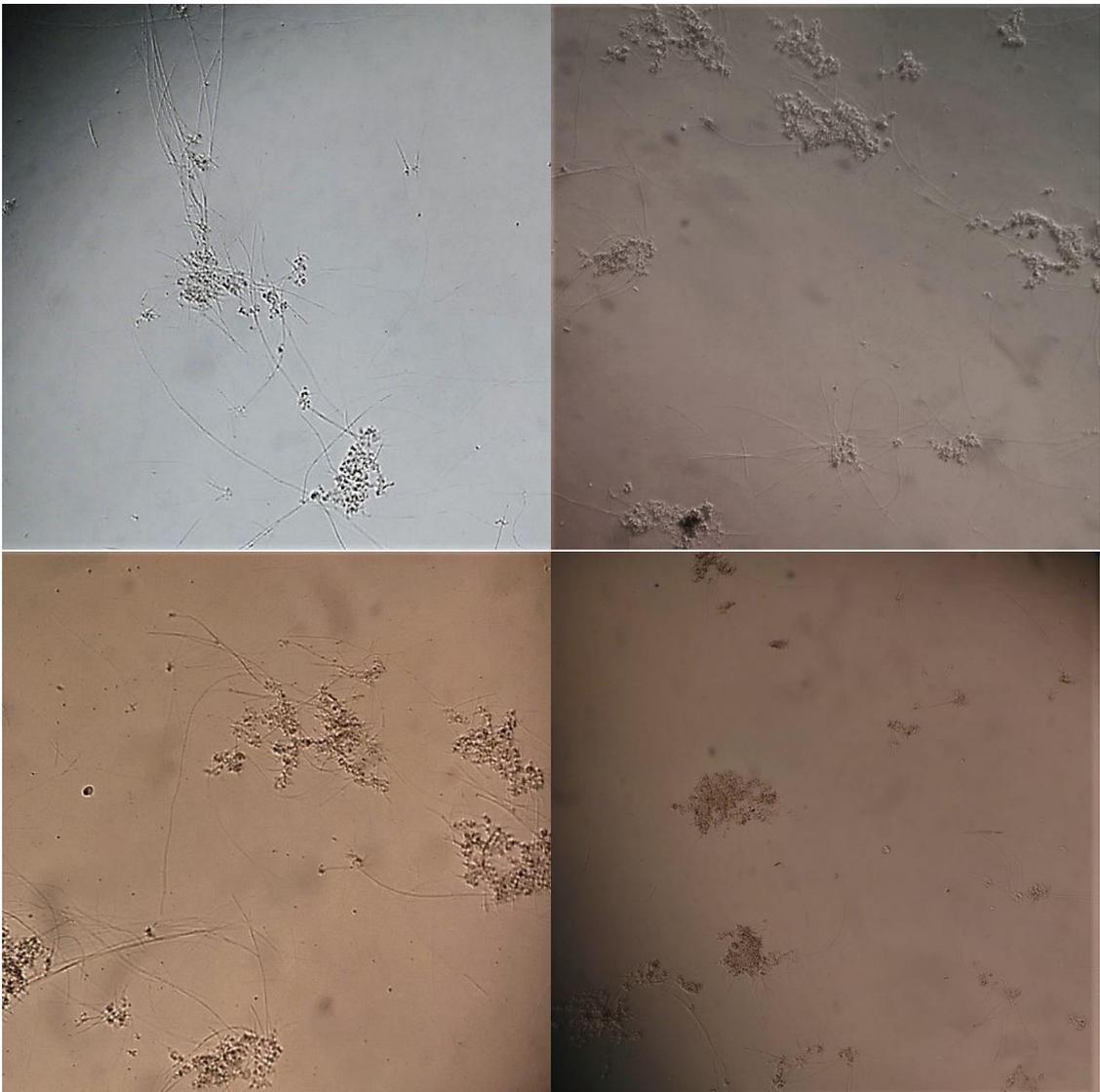
Aumento: 40X





Fecha: 8-8-2016

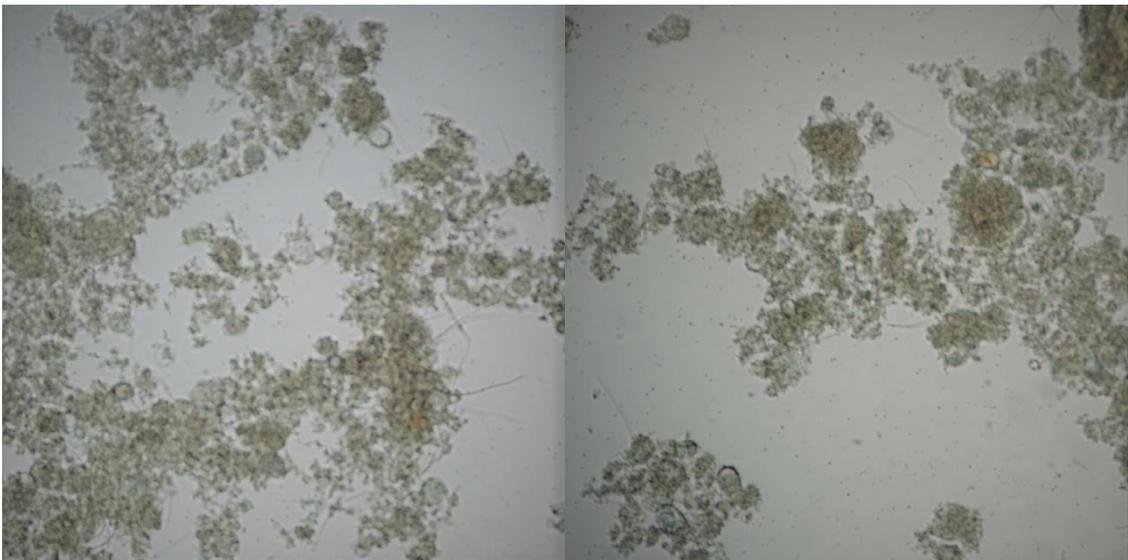
Aumento: 40X

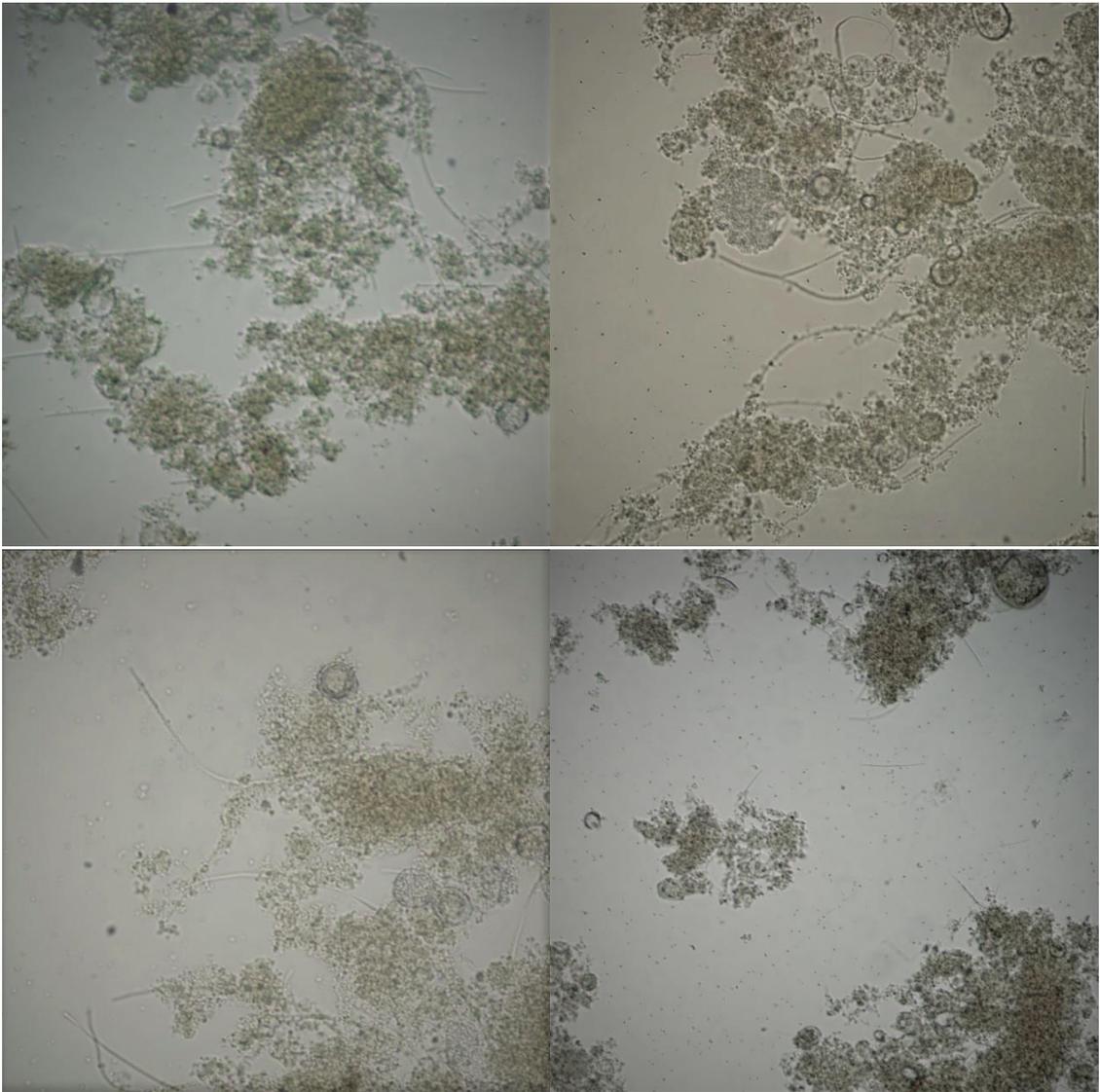




Fecha 30-8-2017

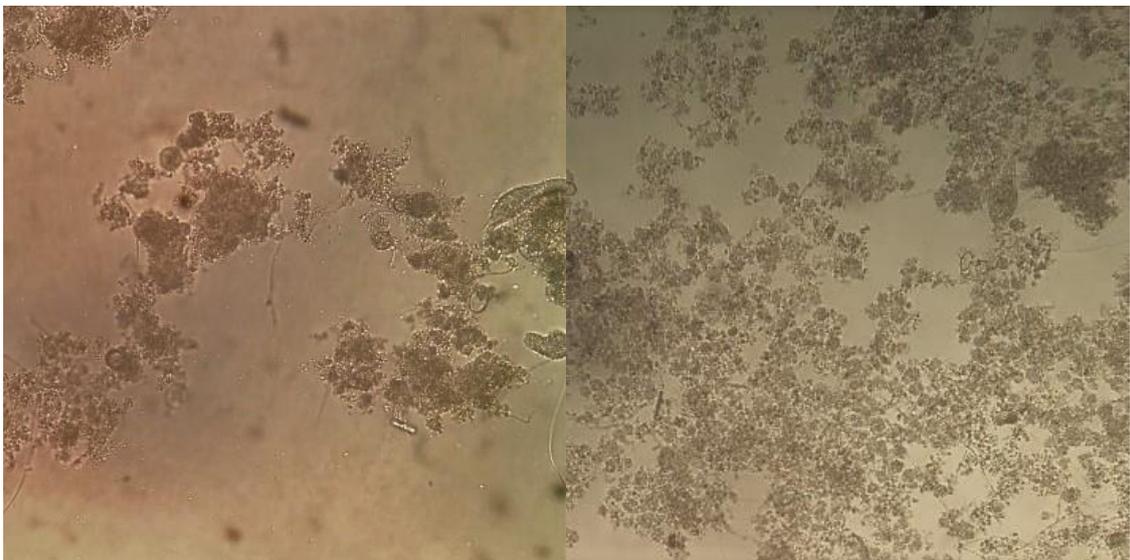
Aumento 40X

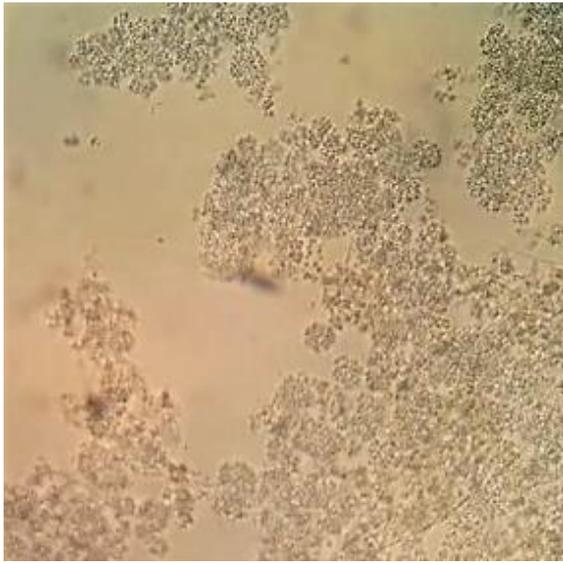
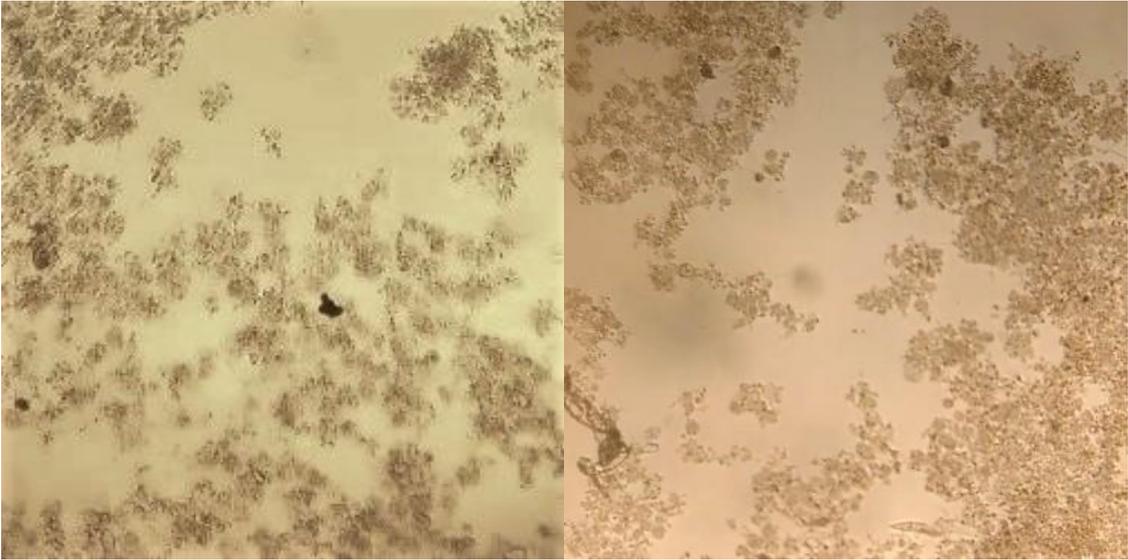




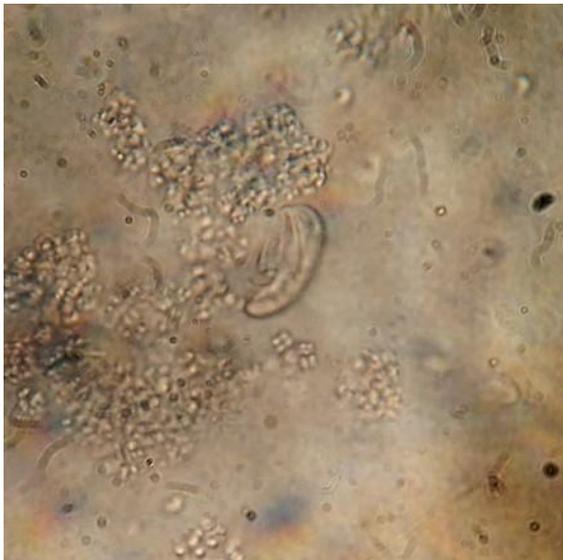
Fecha: 19-9-2016

Aumento 40X



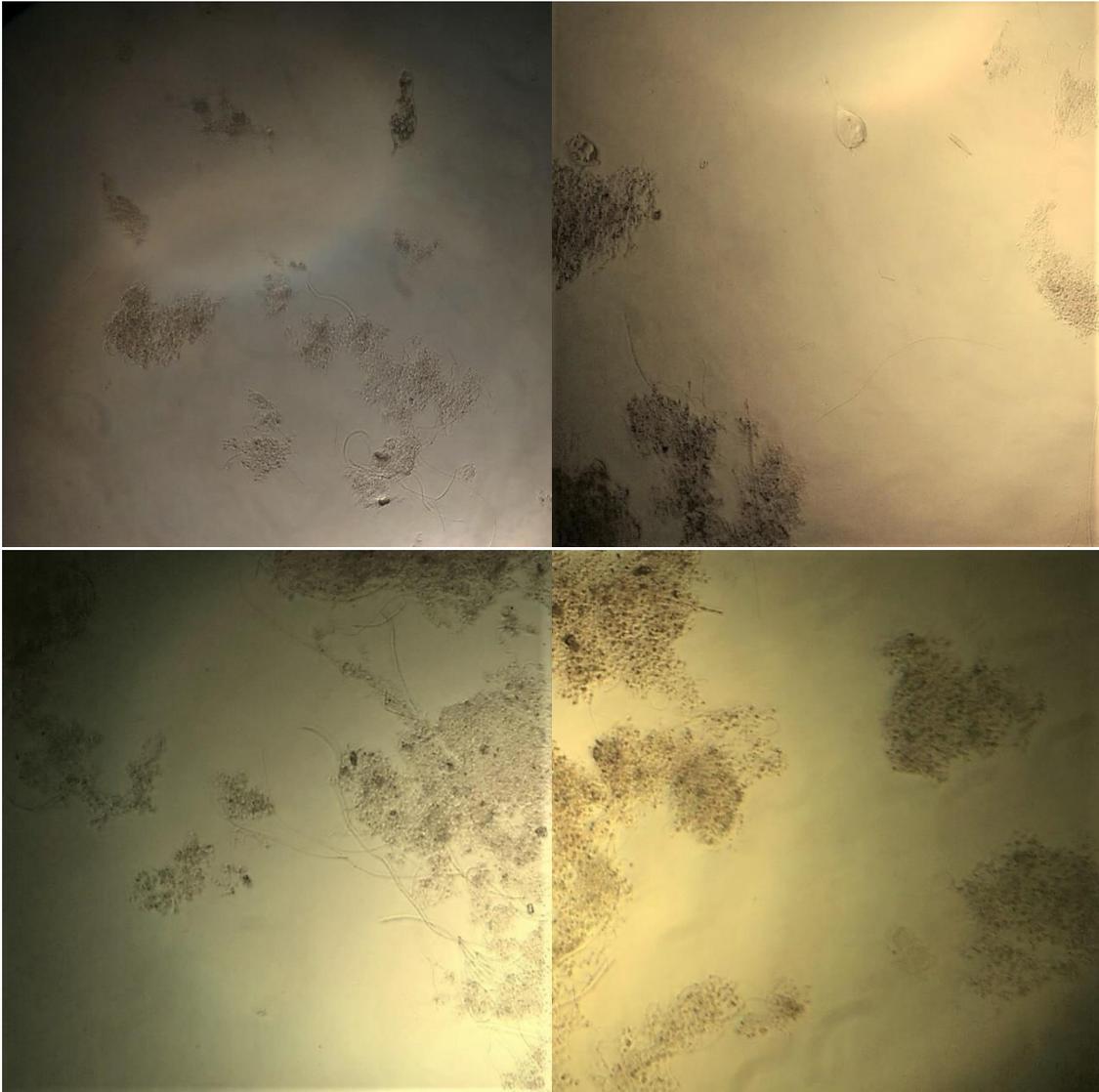


Aumento 100X

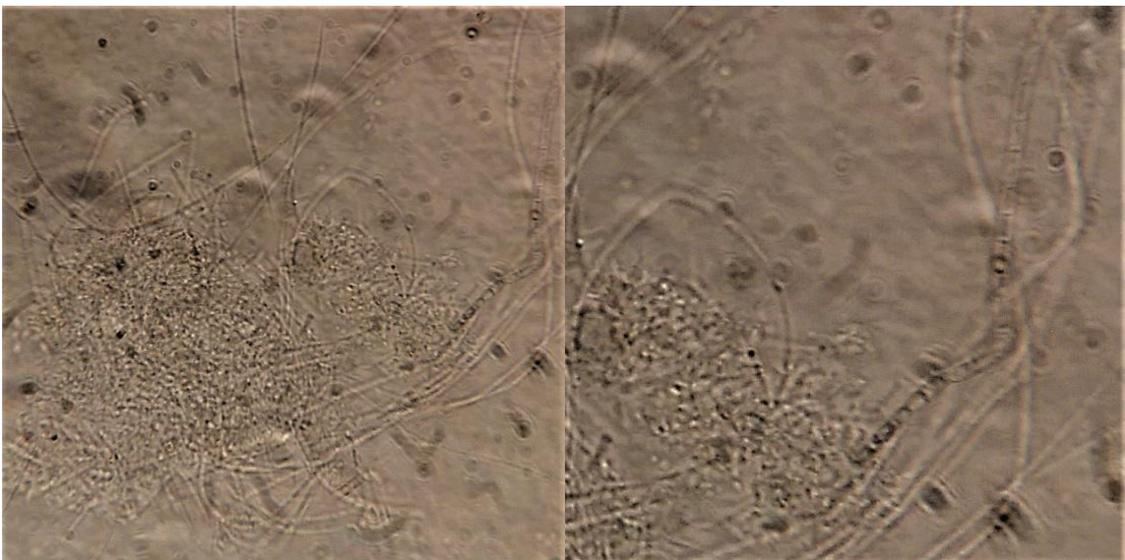


Fecha: 25-10-2016

Aumento 40X

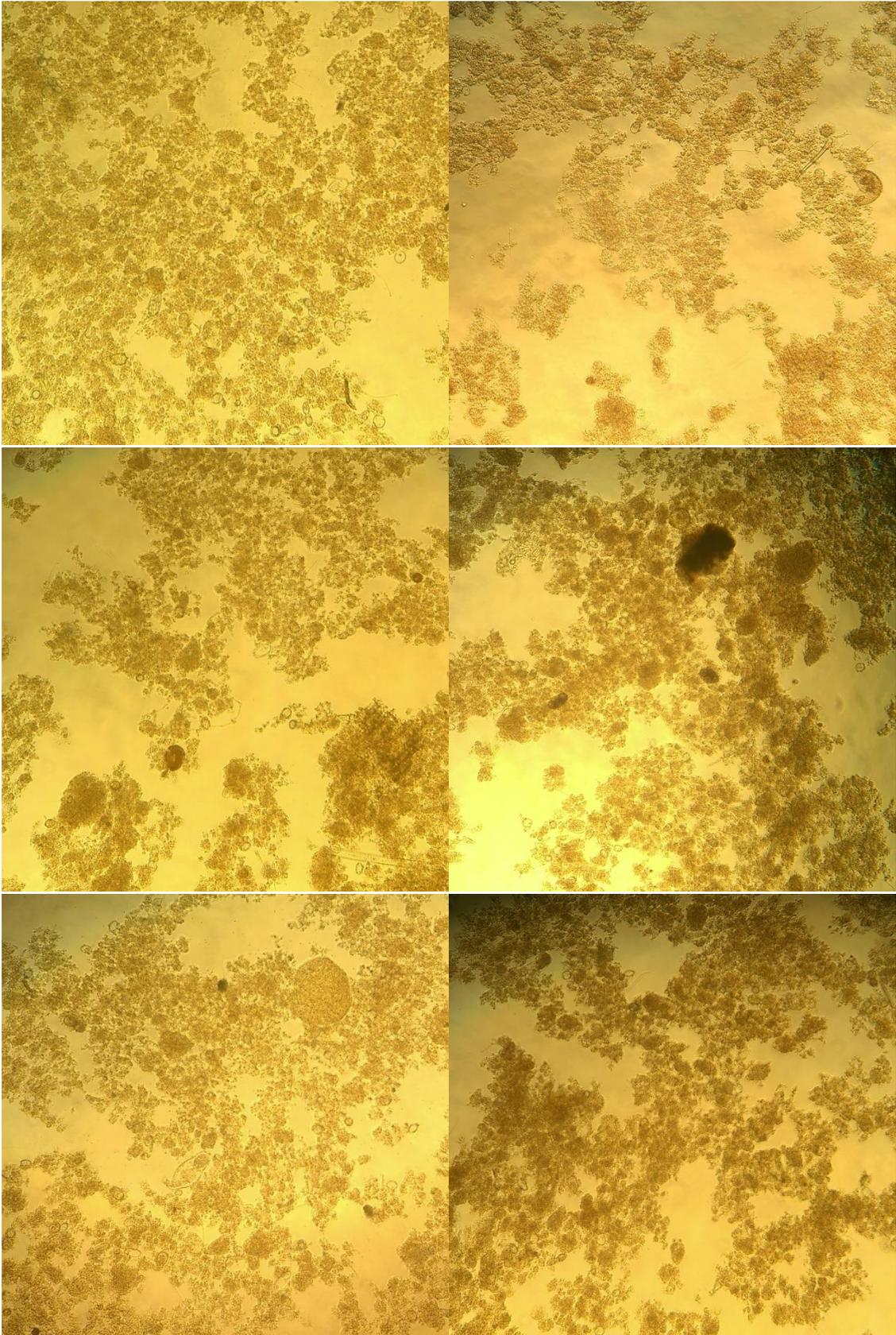


Aumento 100X

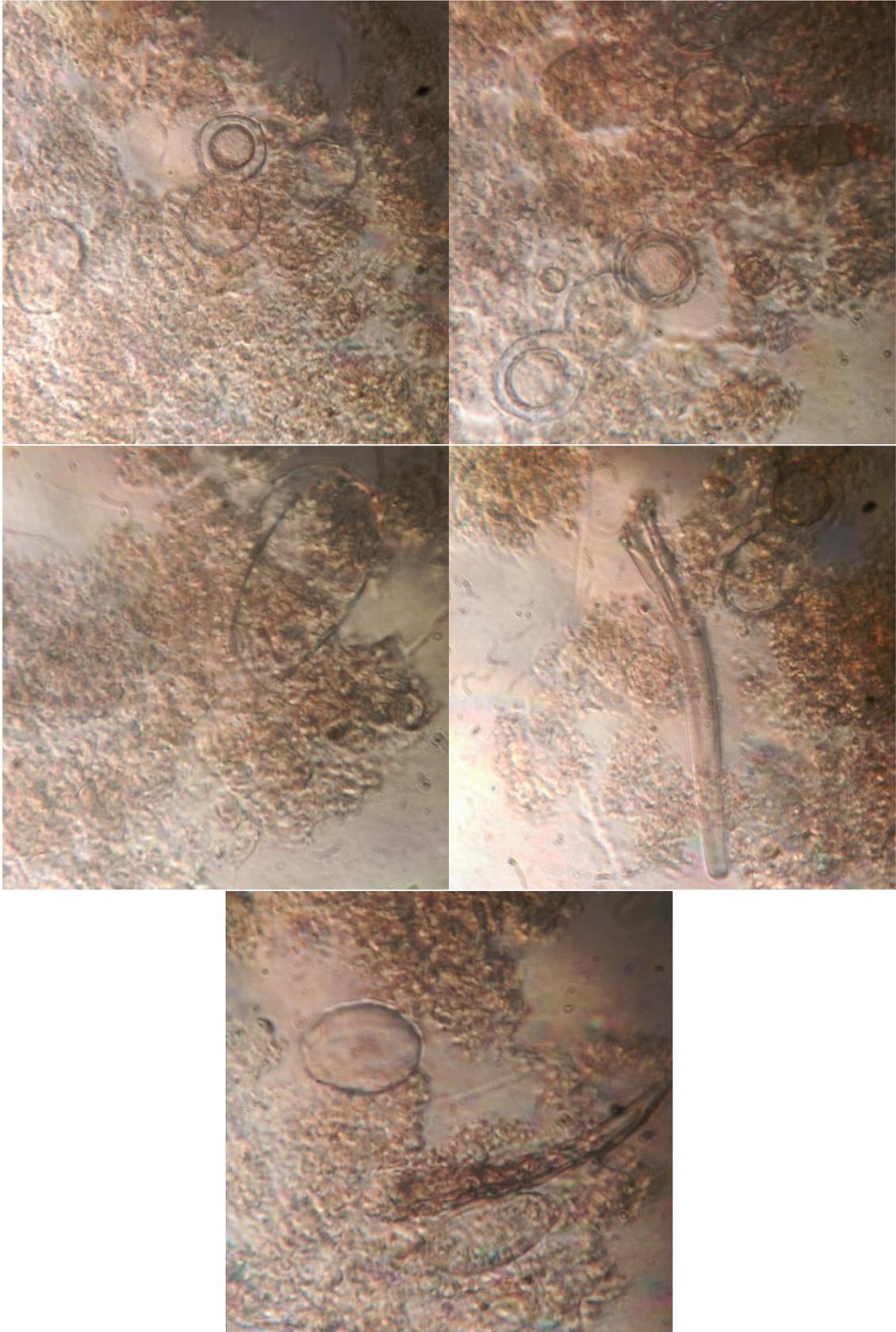


Fecha: 28-3-2017

Aumento: 40X

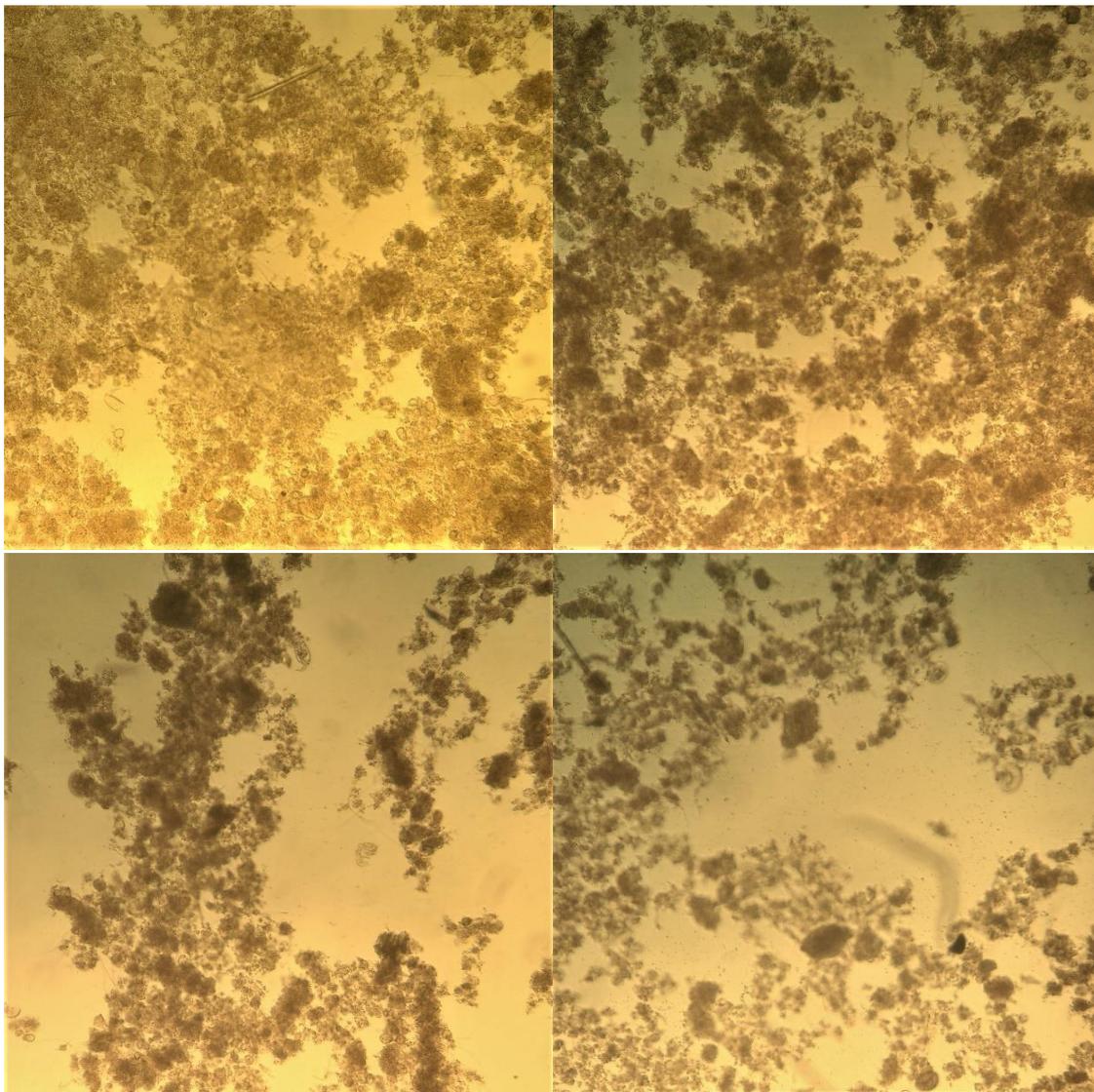


Aumento 100X

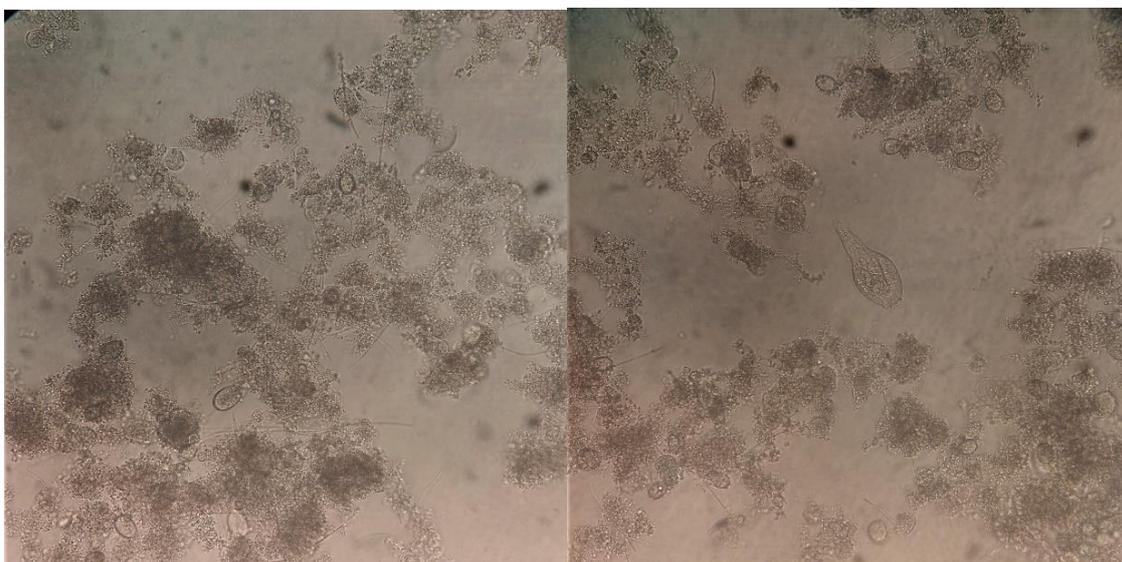


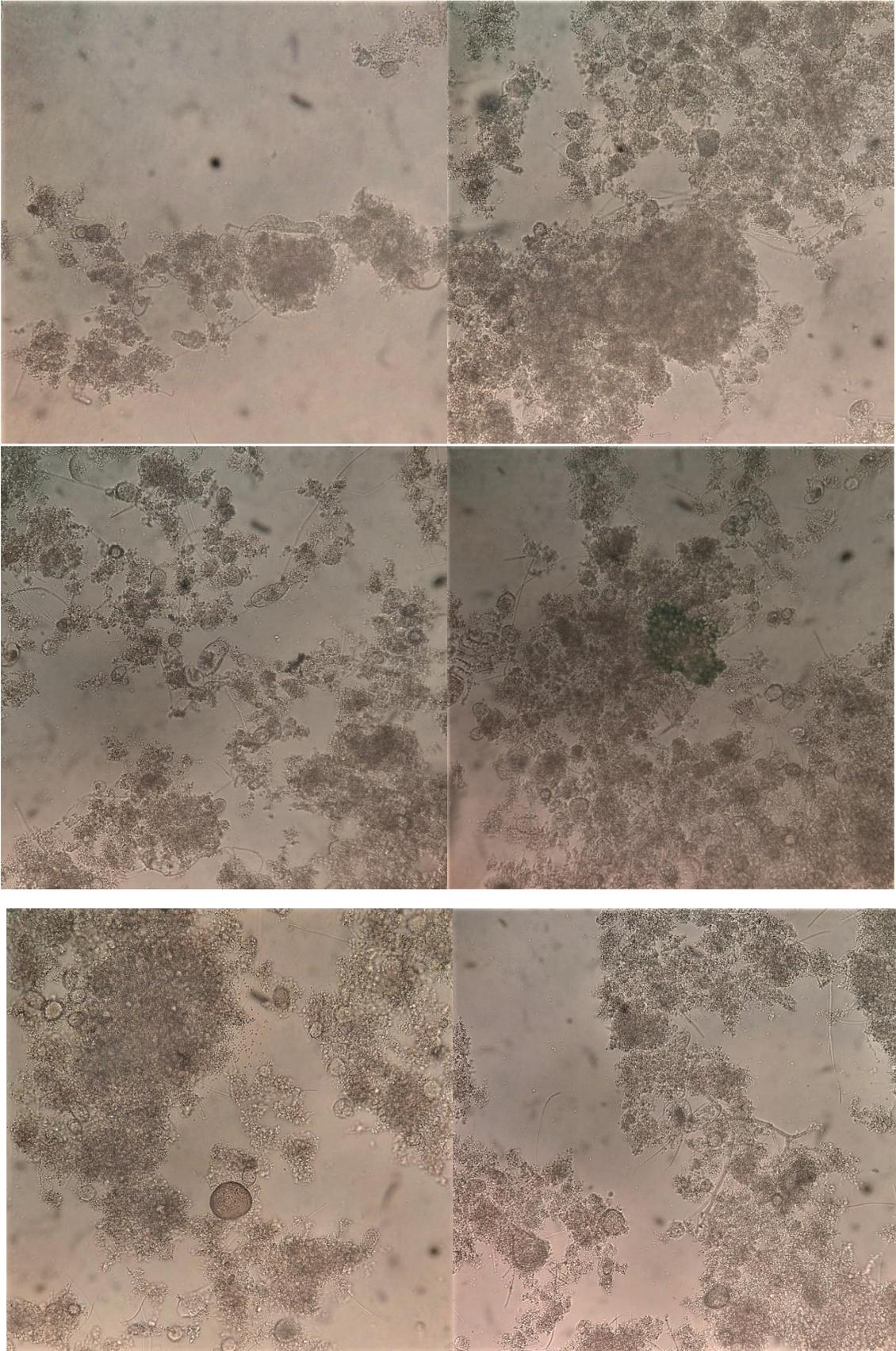
Fecha: 9-5-2017

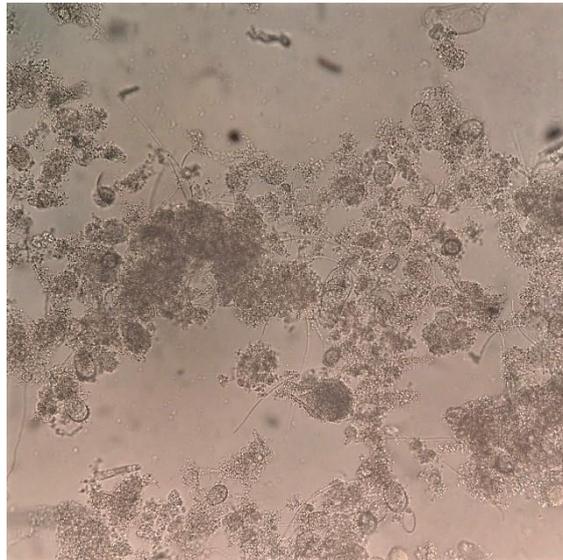
Aumento 10X



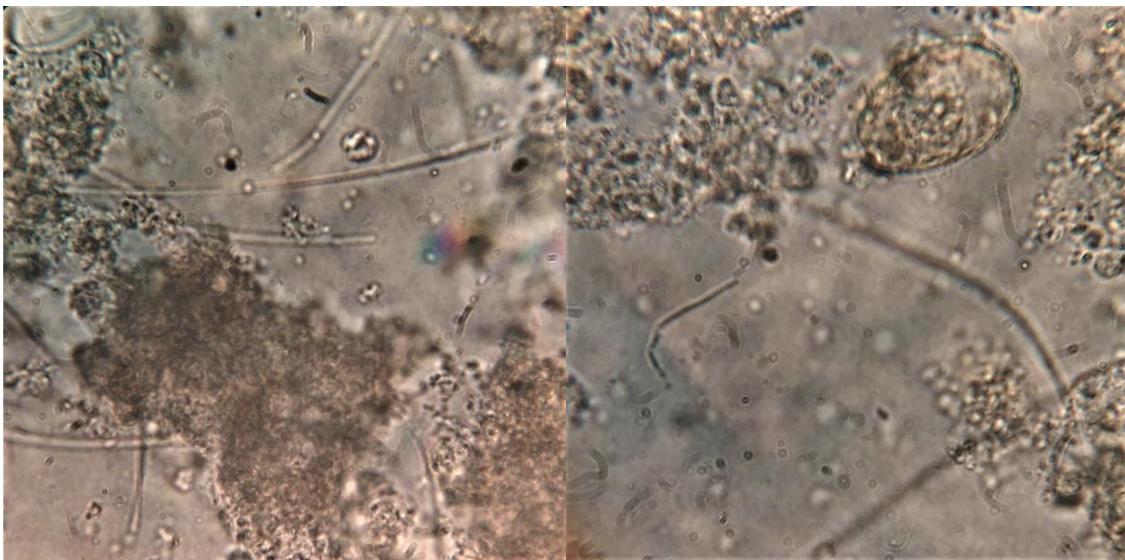
Aumento 20X





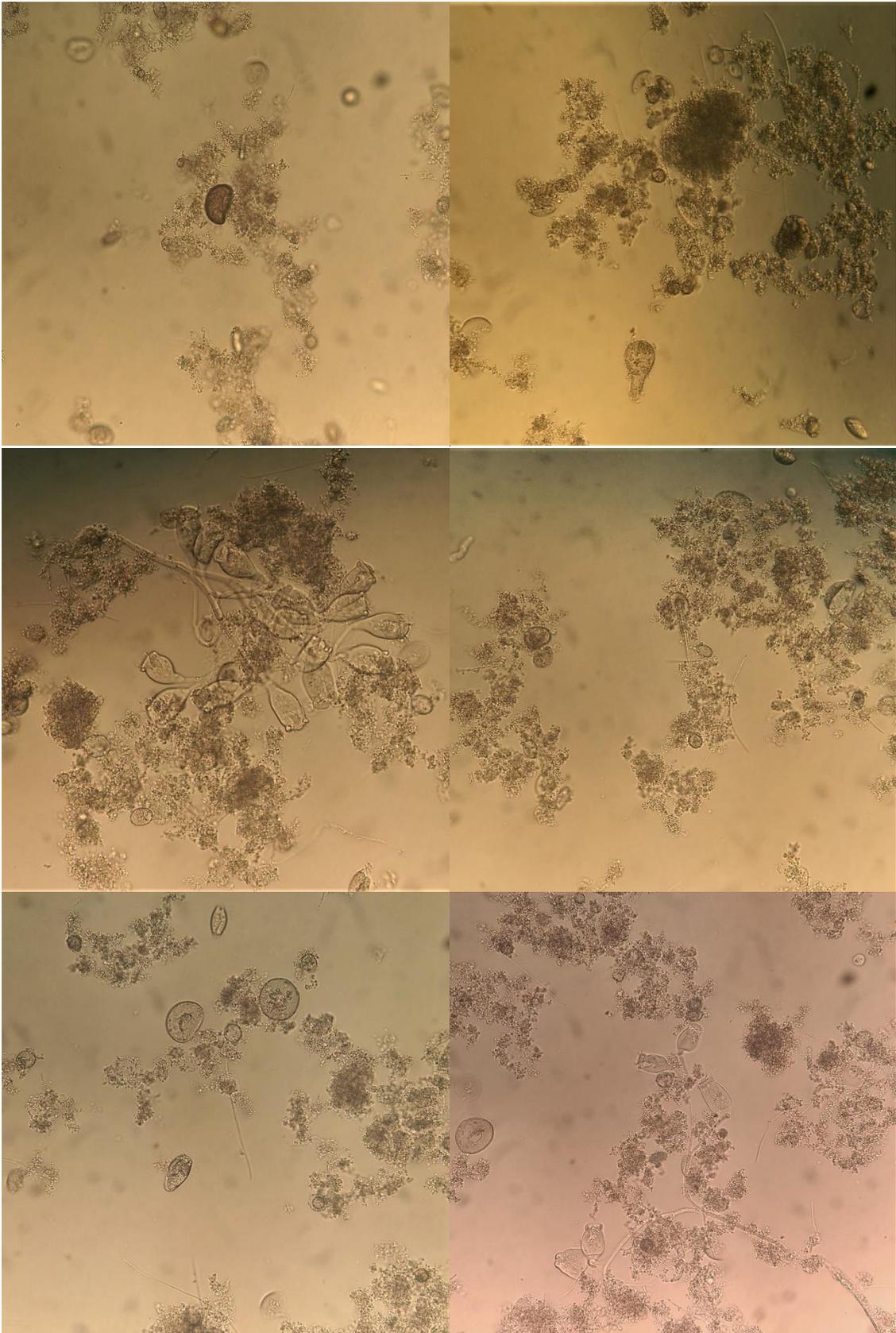


Aumento 100X

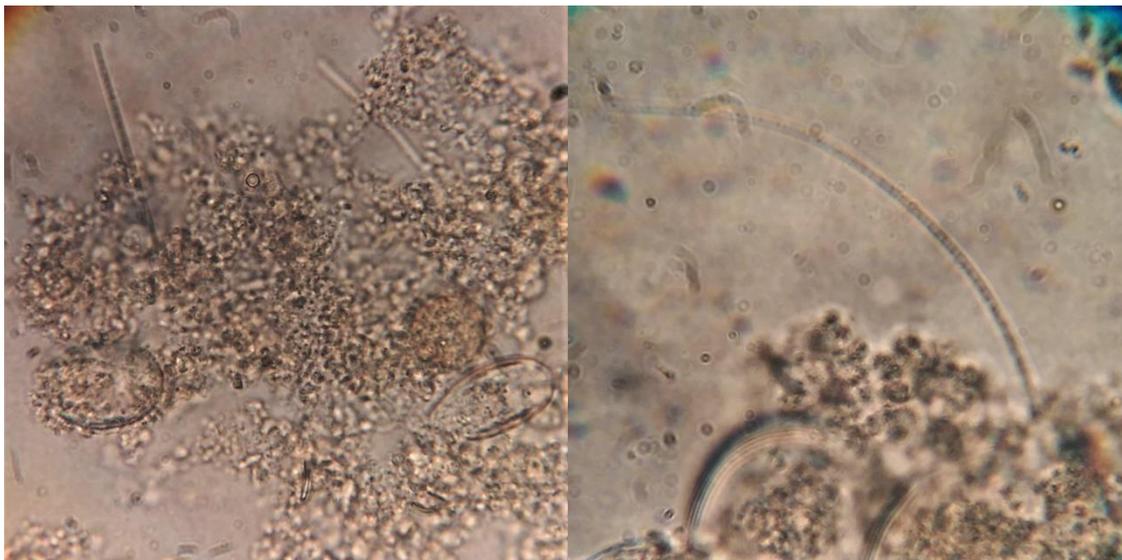


Fecha 23-5-2017

Aumento 40X

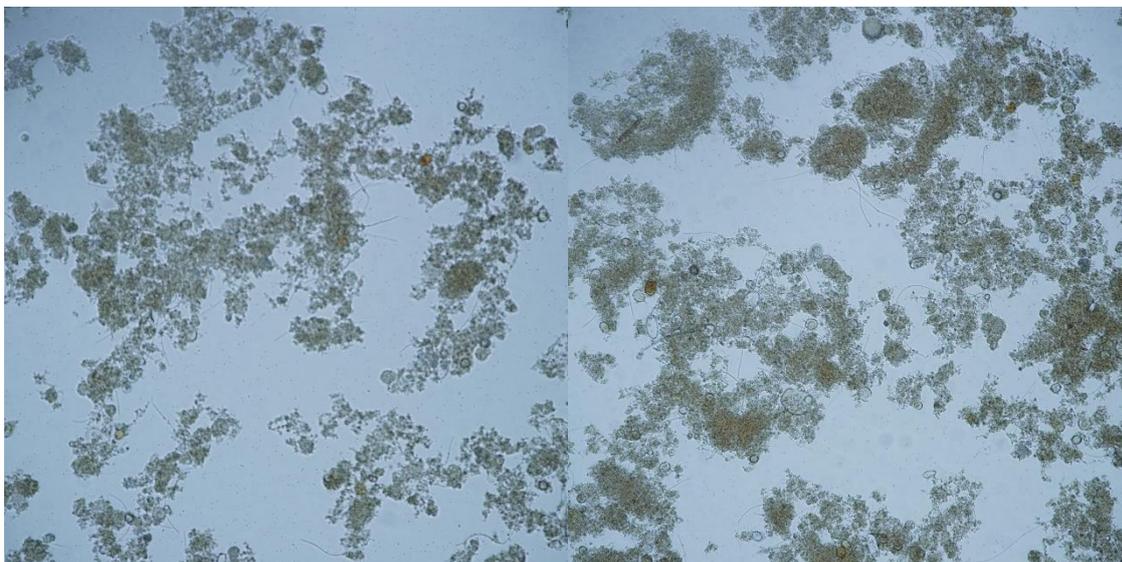


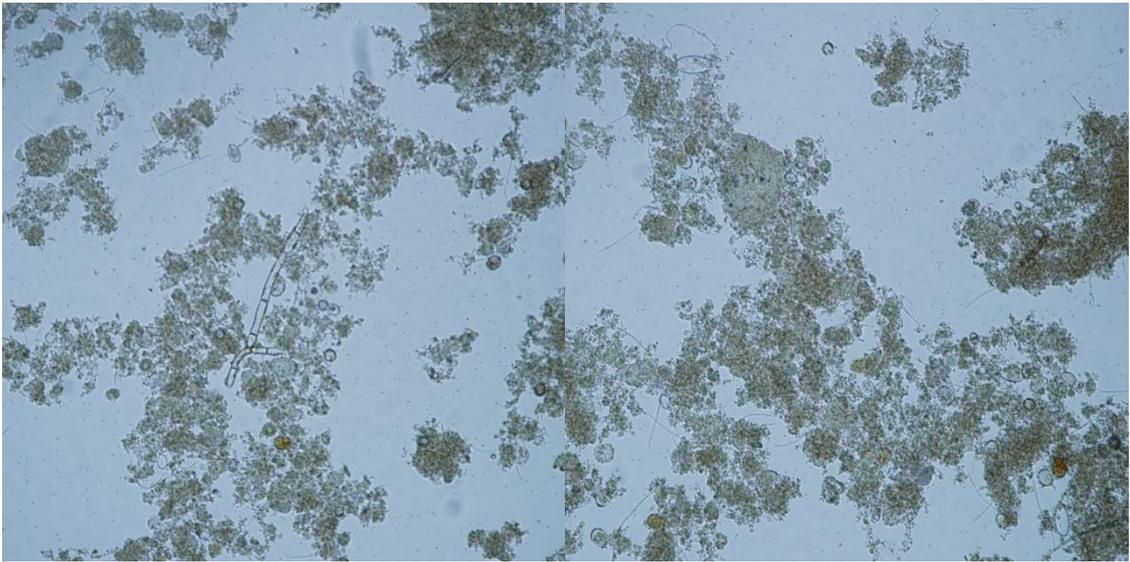
Aumento 100X



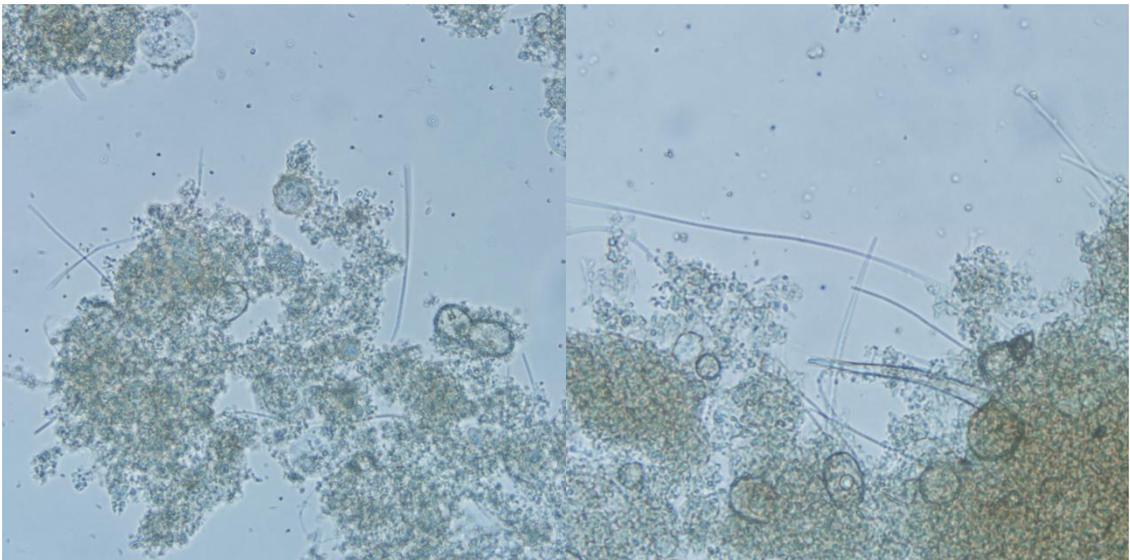
Fecha: 13-6-2017

Aumento 10X

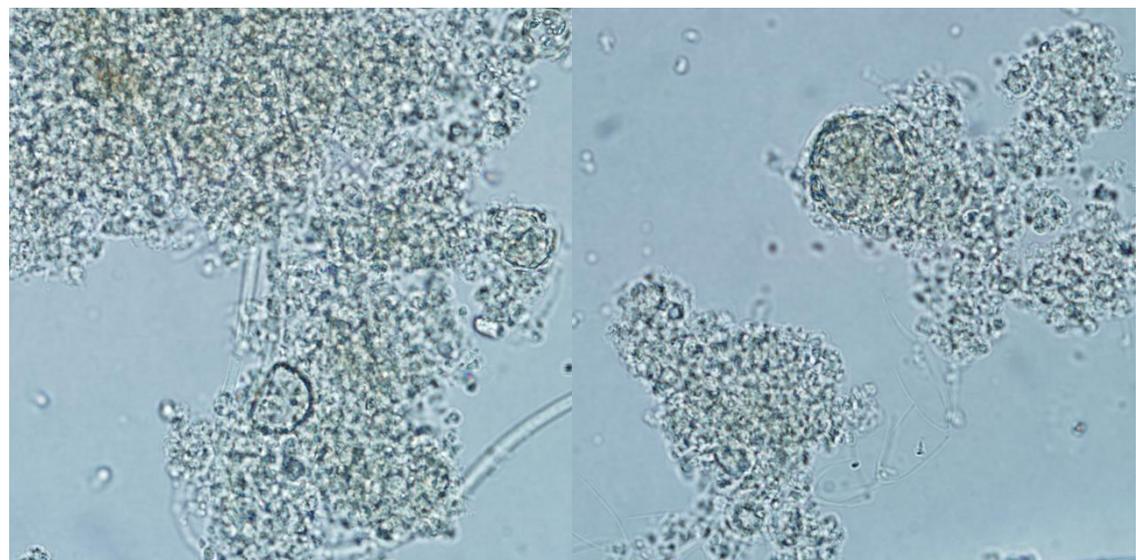




Aumento 40X:



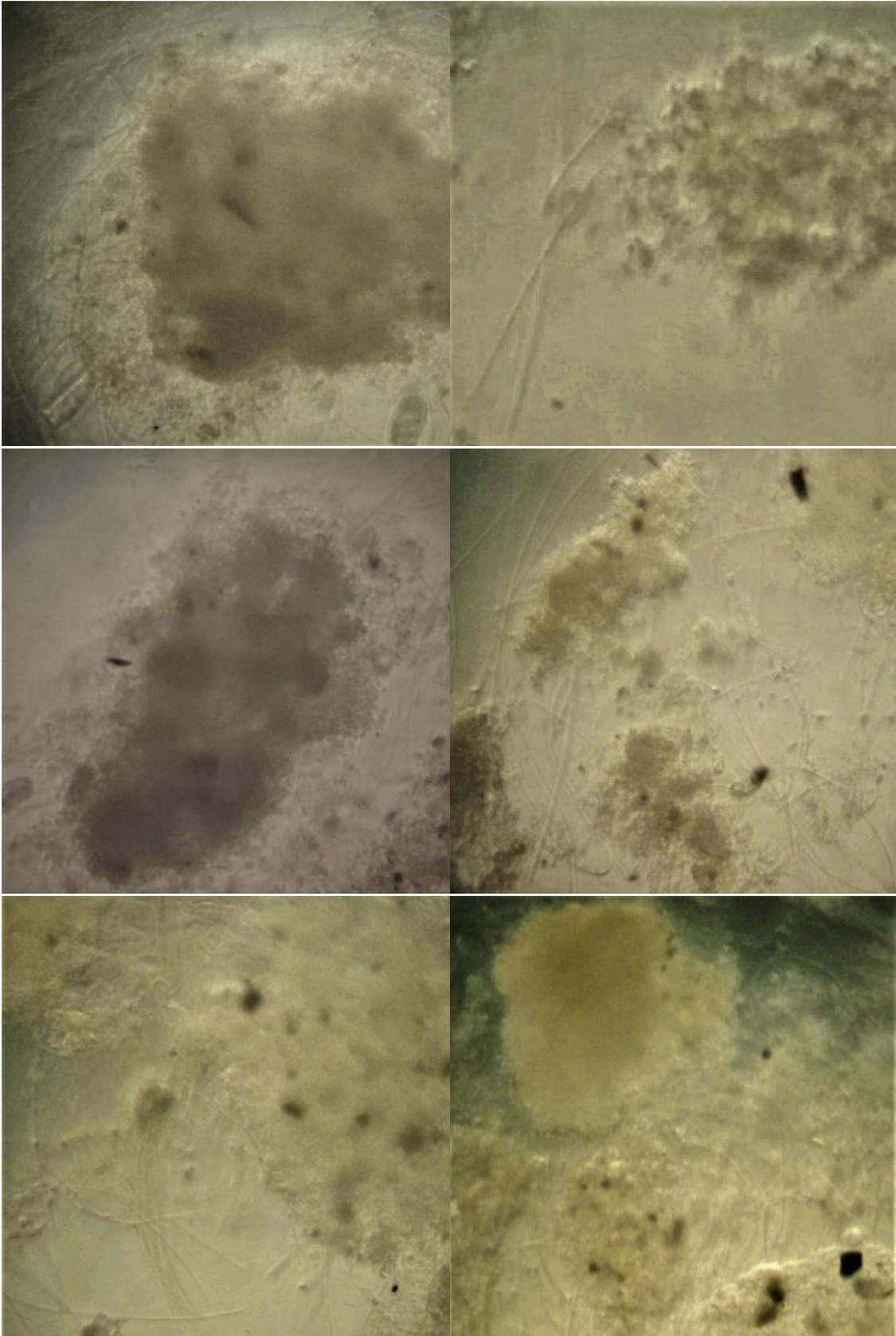
Aumento 100X:

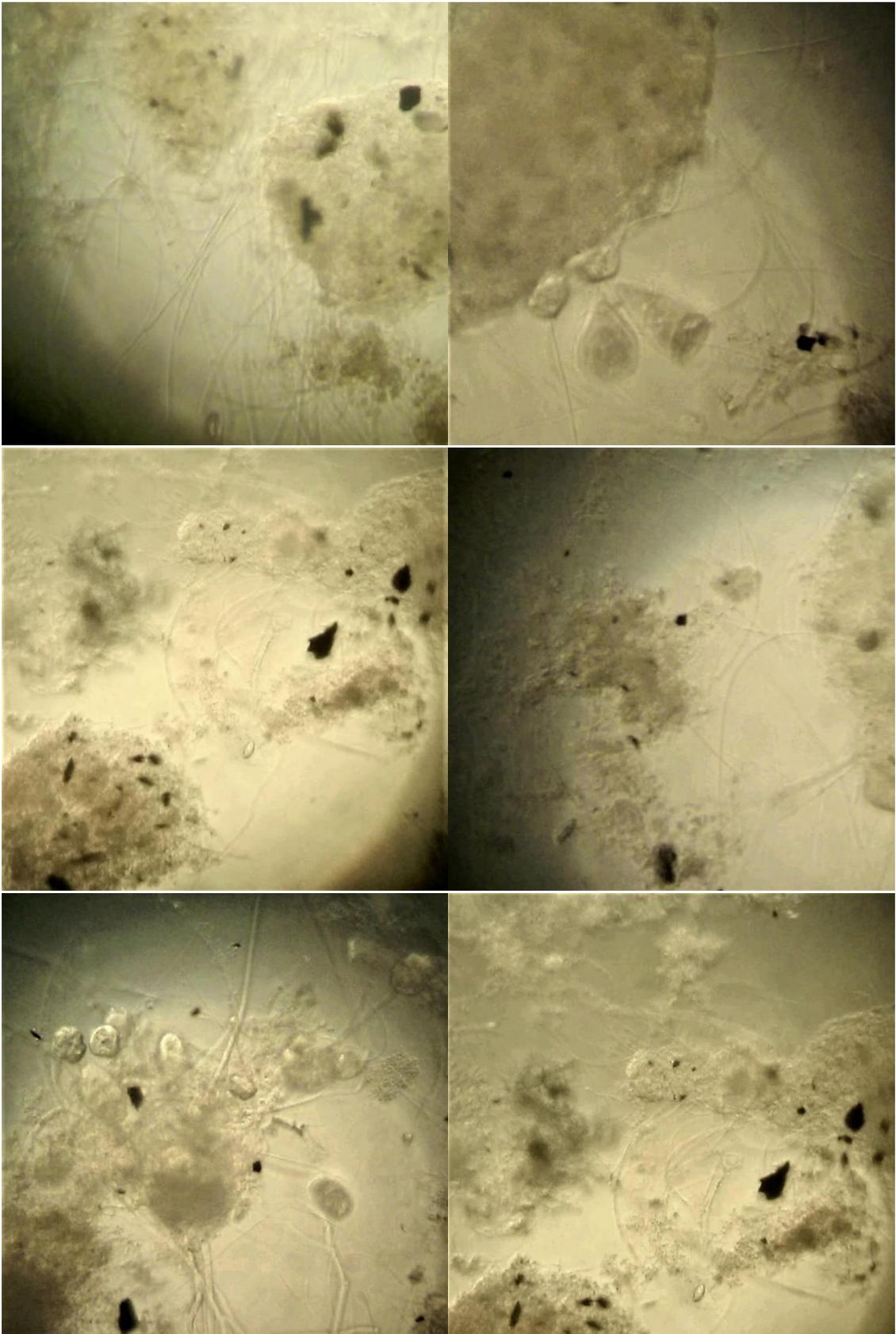


**BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS**

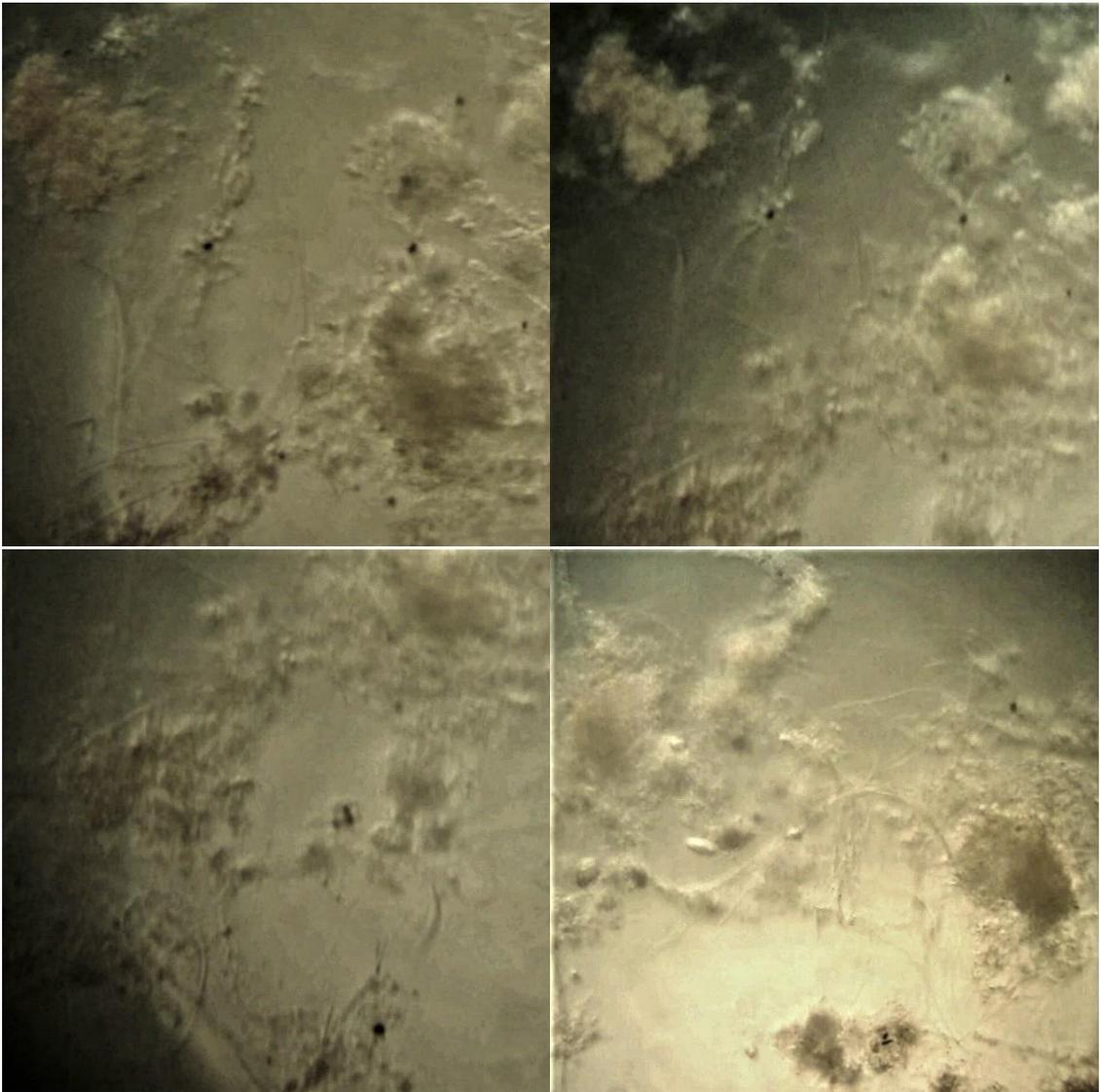
Fecha: 20-5-2016

Aumento 40X





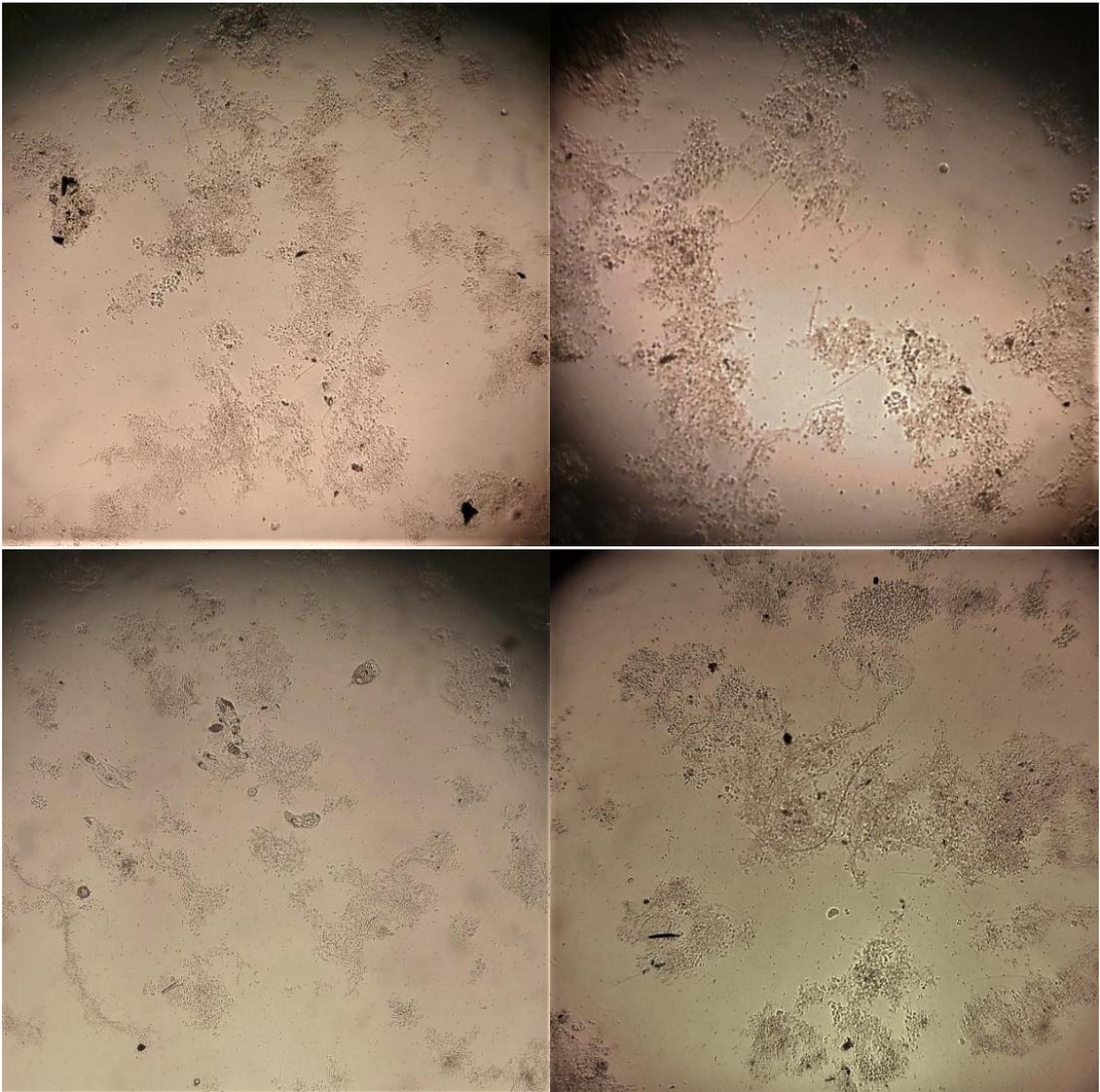




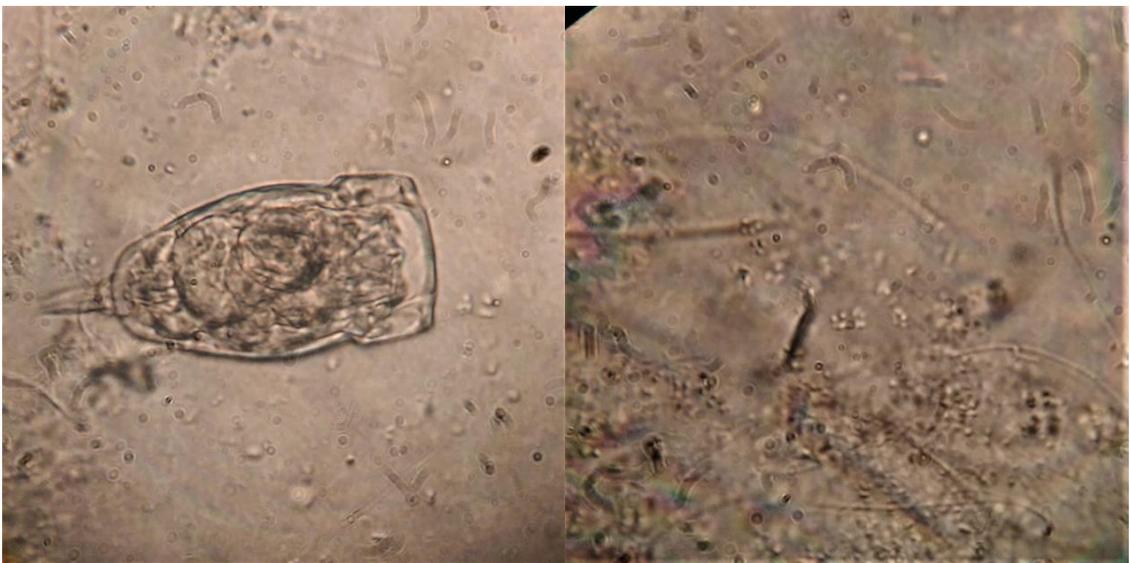
Fecha: 10-8-2016

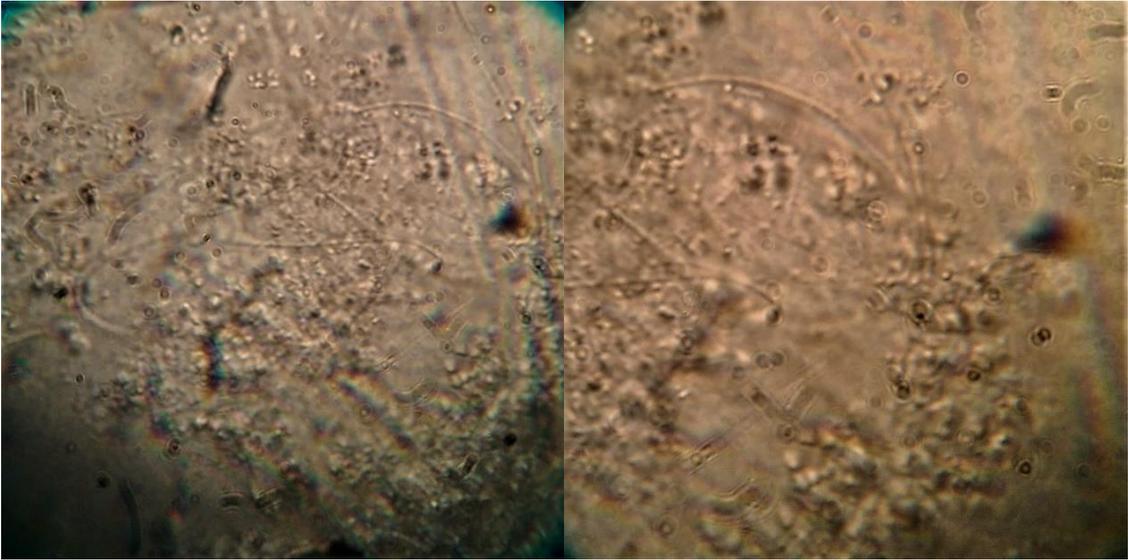
Aumento 40X





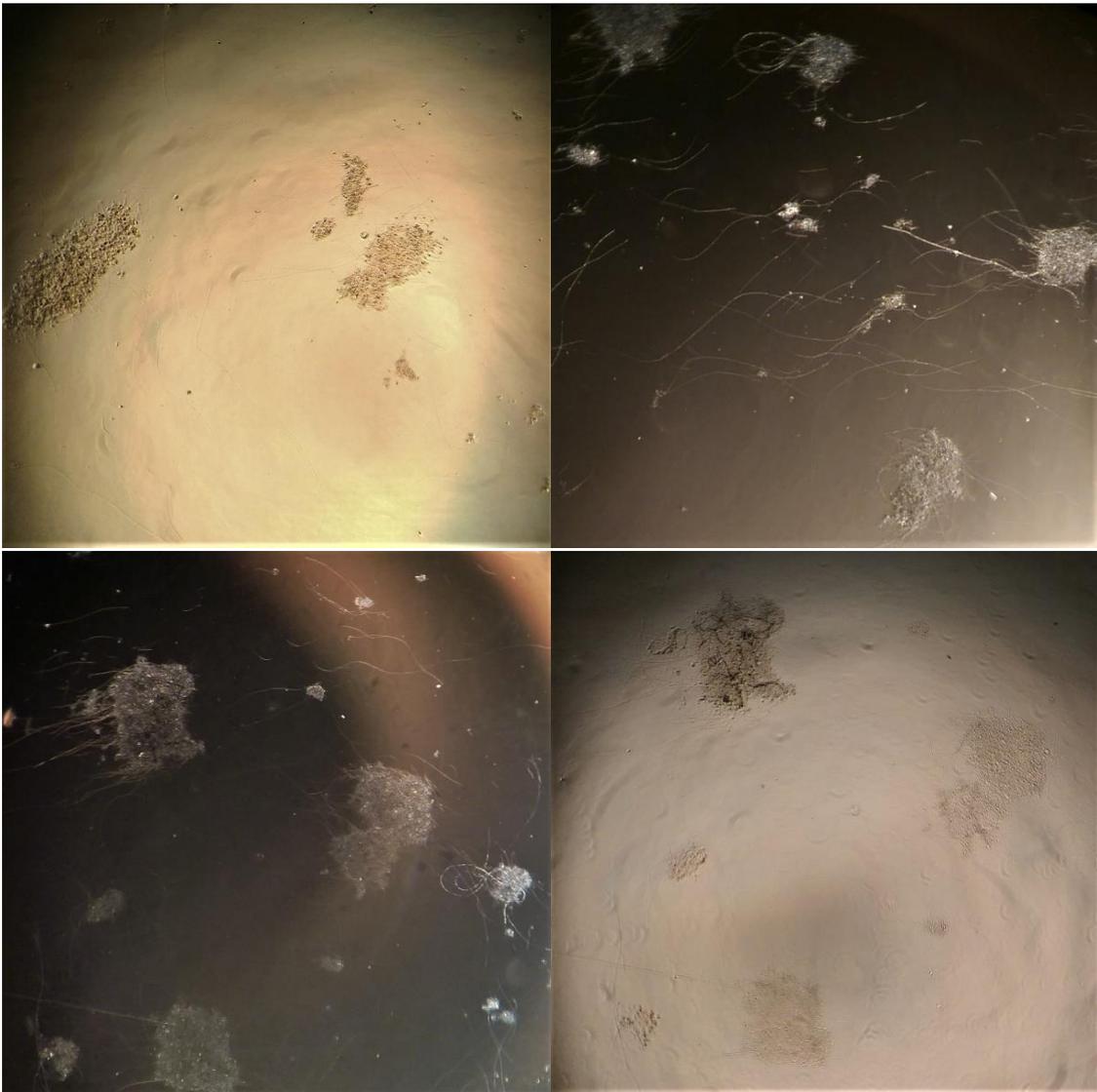
Aumento 100X



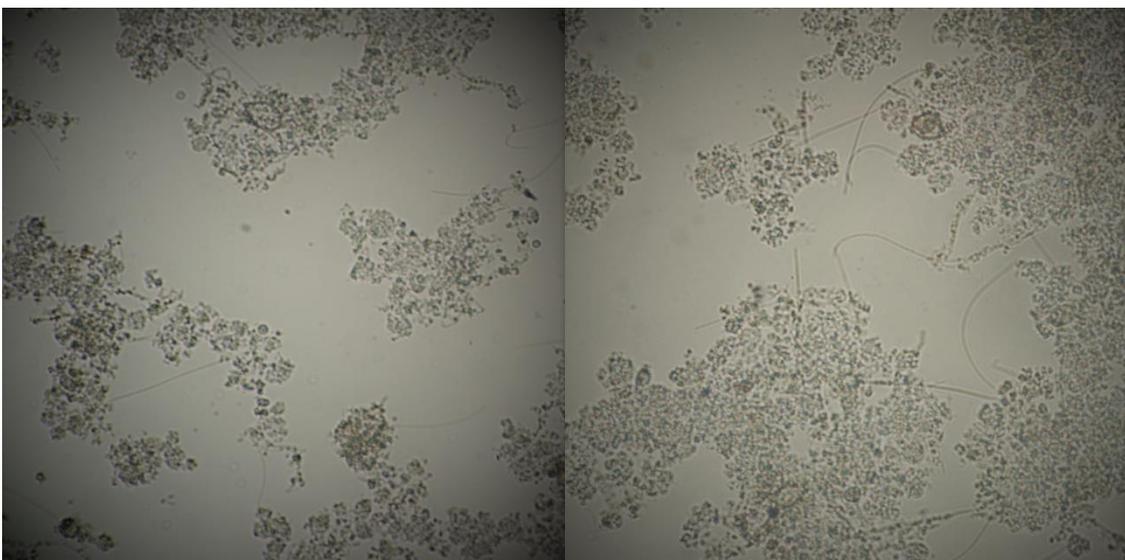


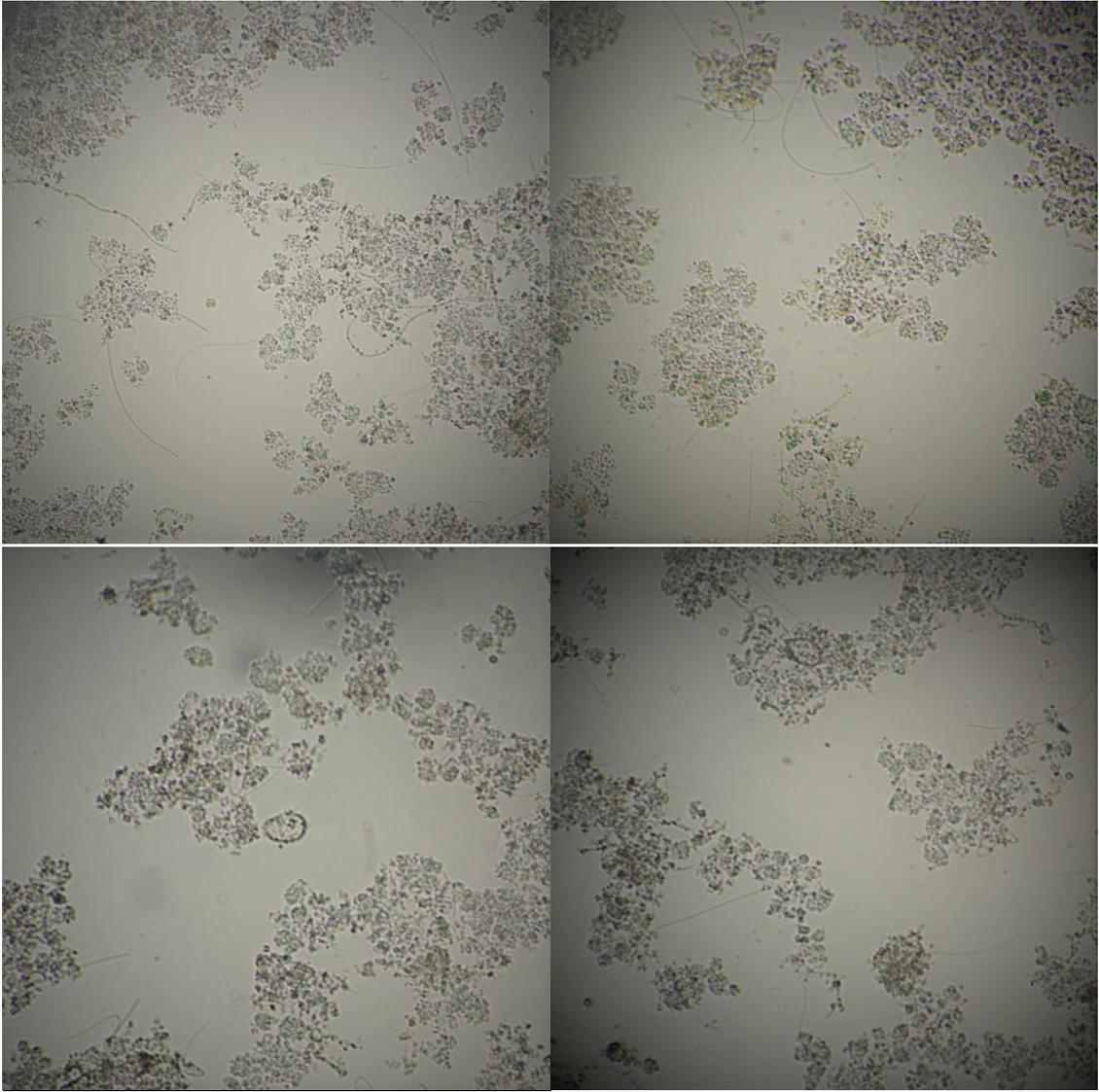
Fecha: 1-9-2016

Aumento 40X



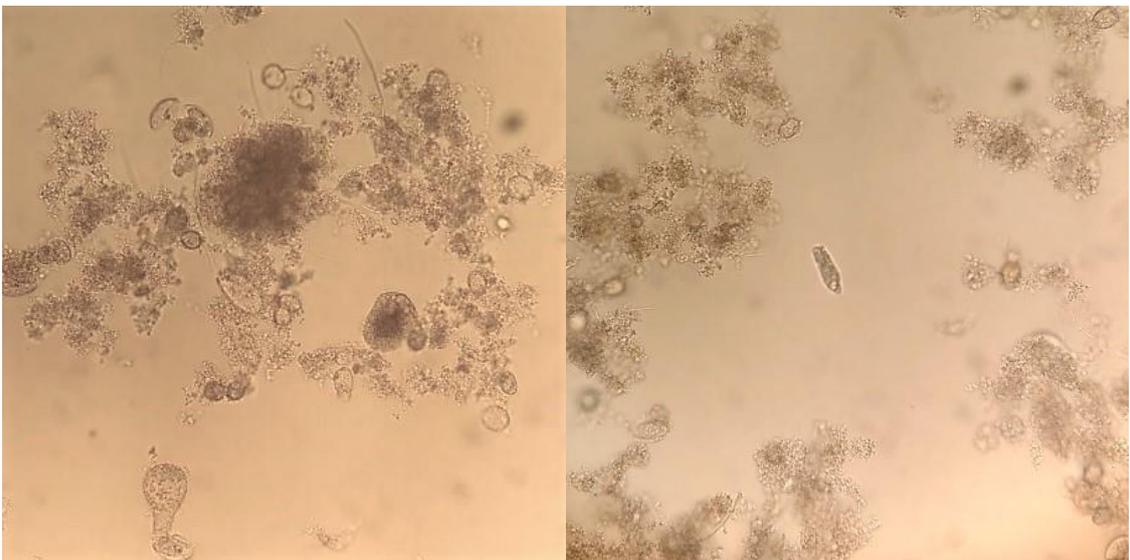
Fecha 20-9-2016

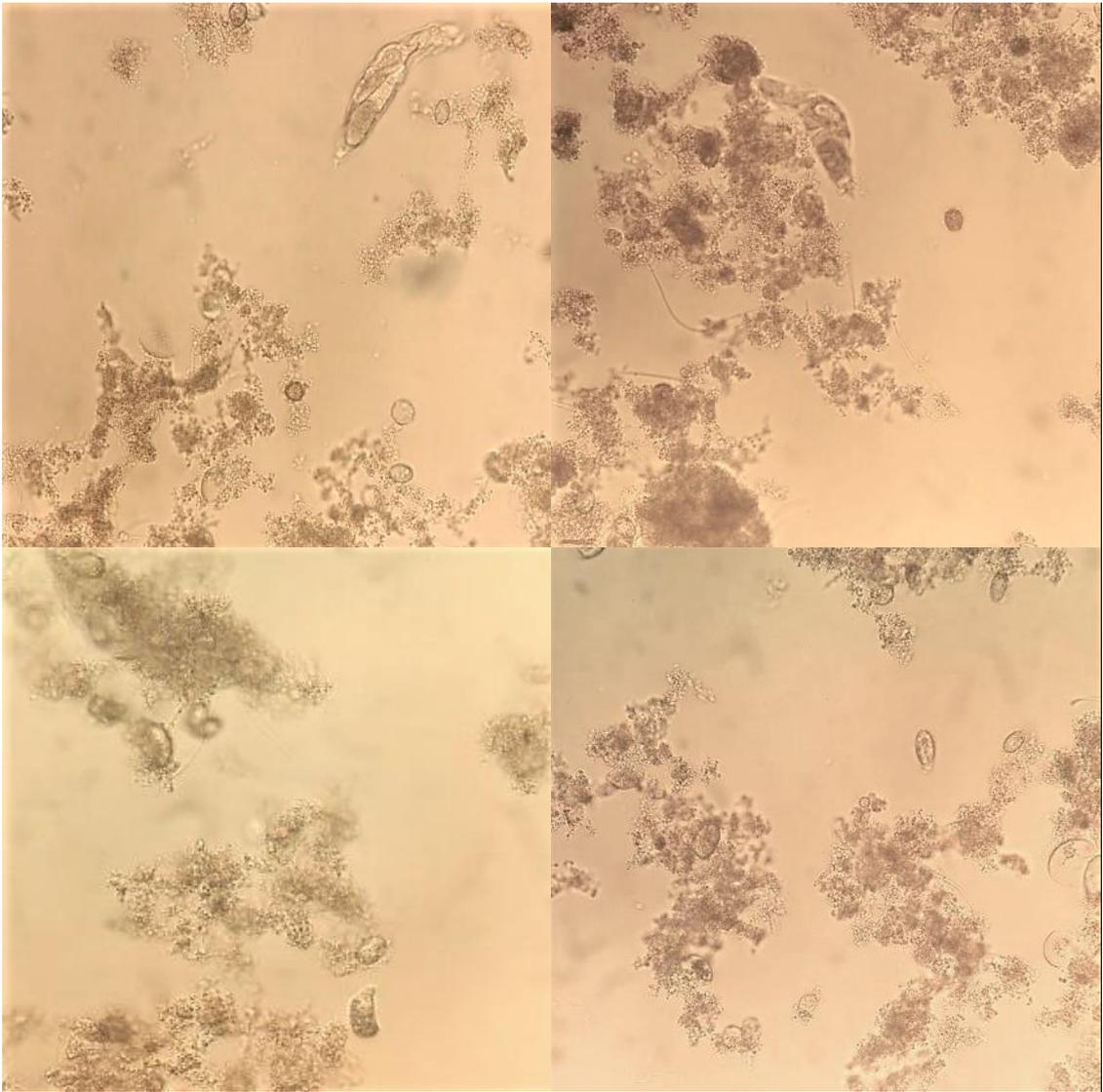




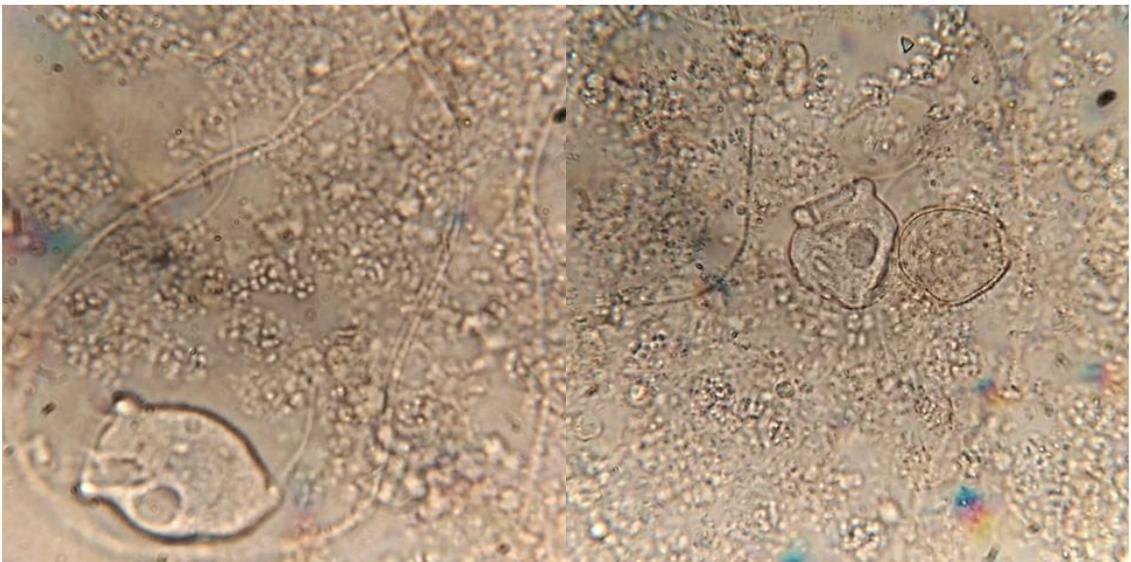
Fecha: 26-10-2016

Aumento 40X



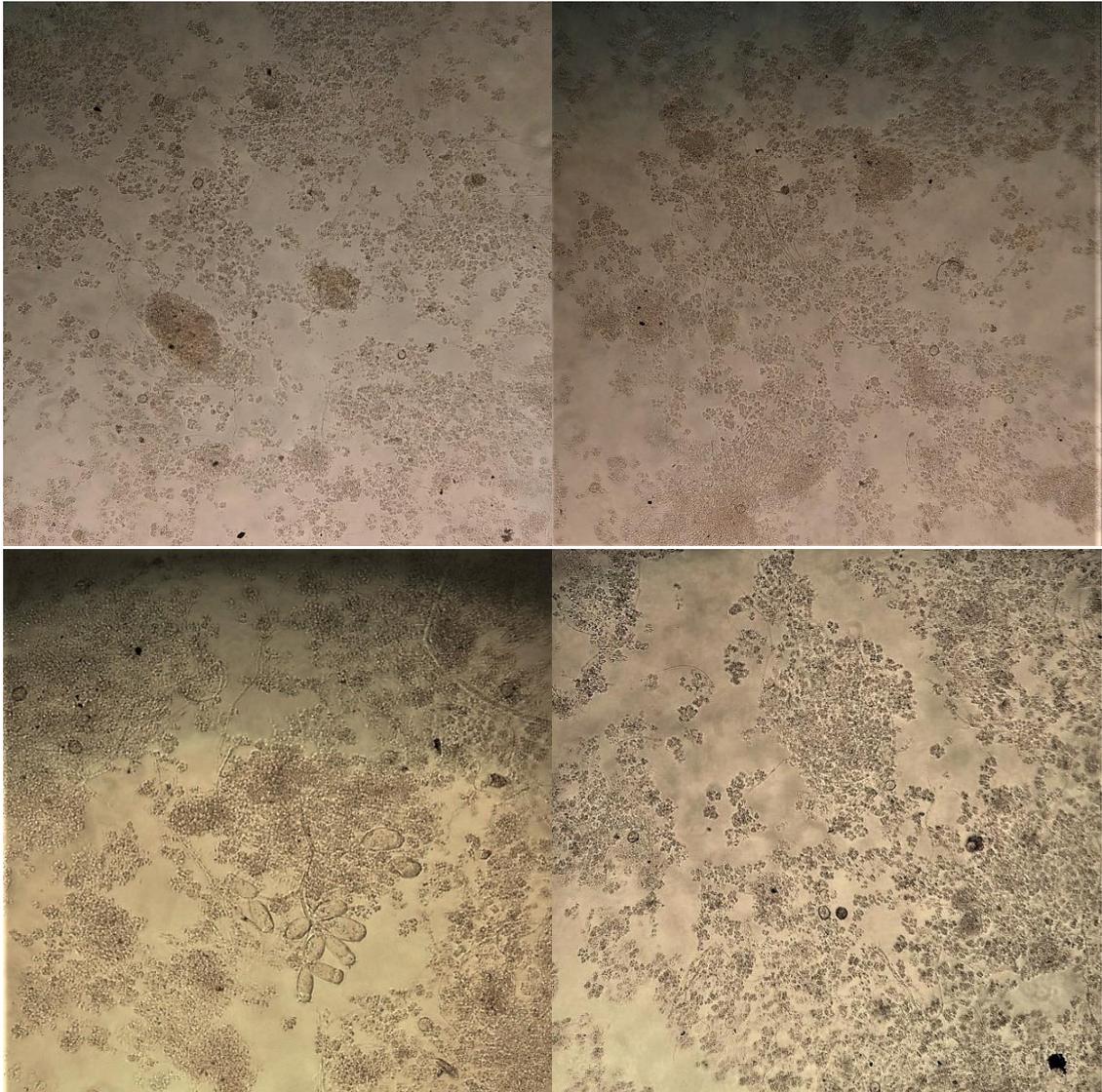


·  
·  
Aumento 100X

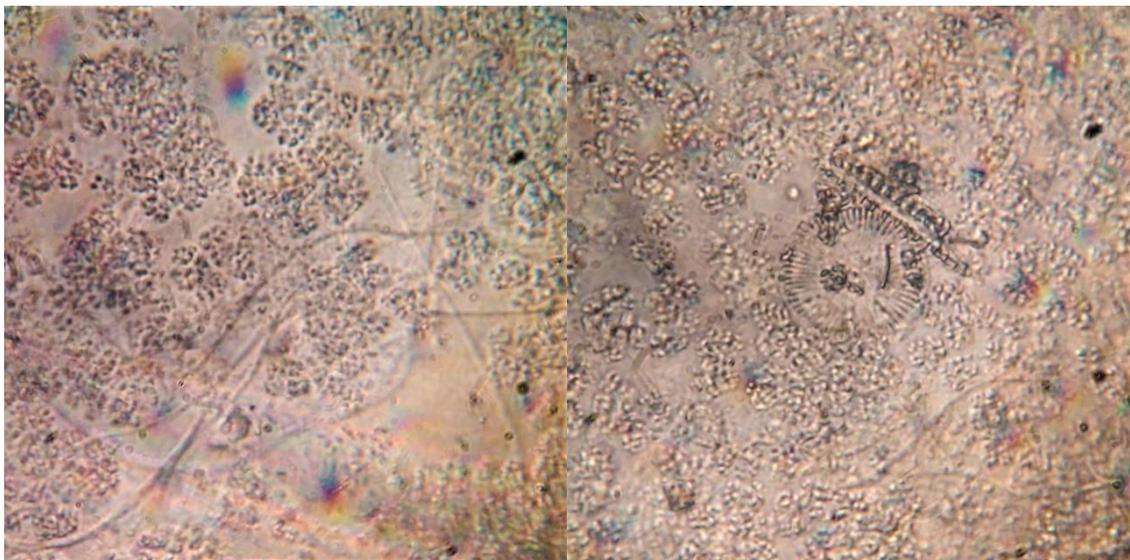


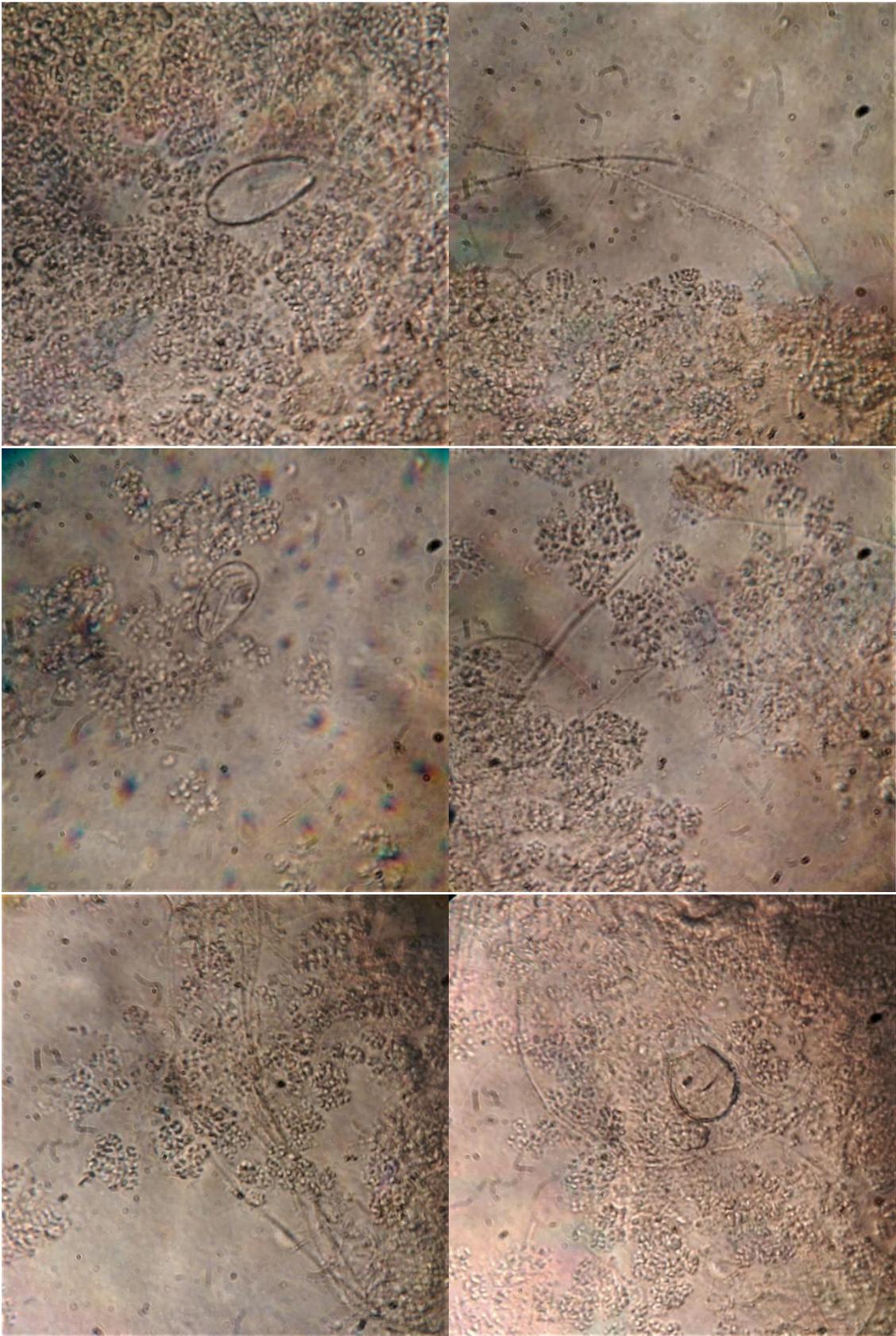
Fecha: 24-3-2017

Aumento 40X



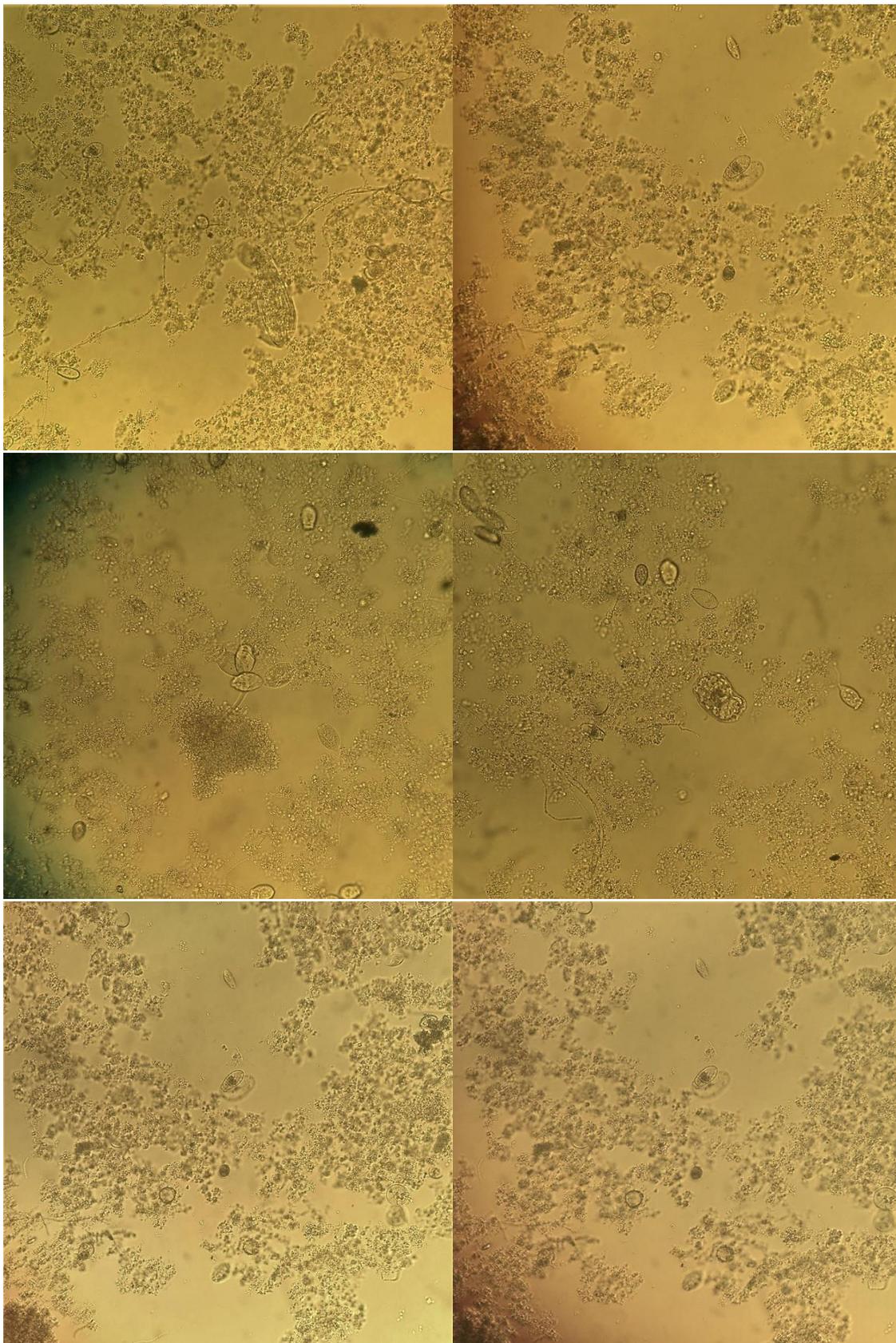
Aumento 100X

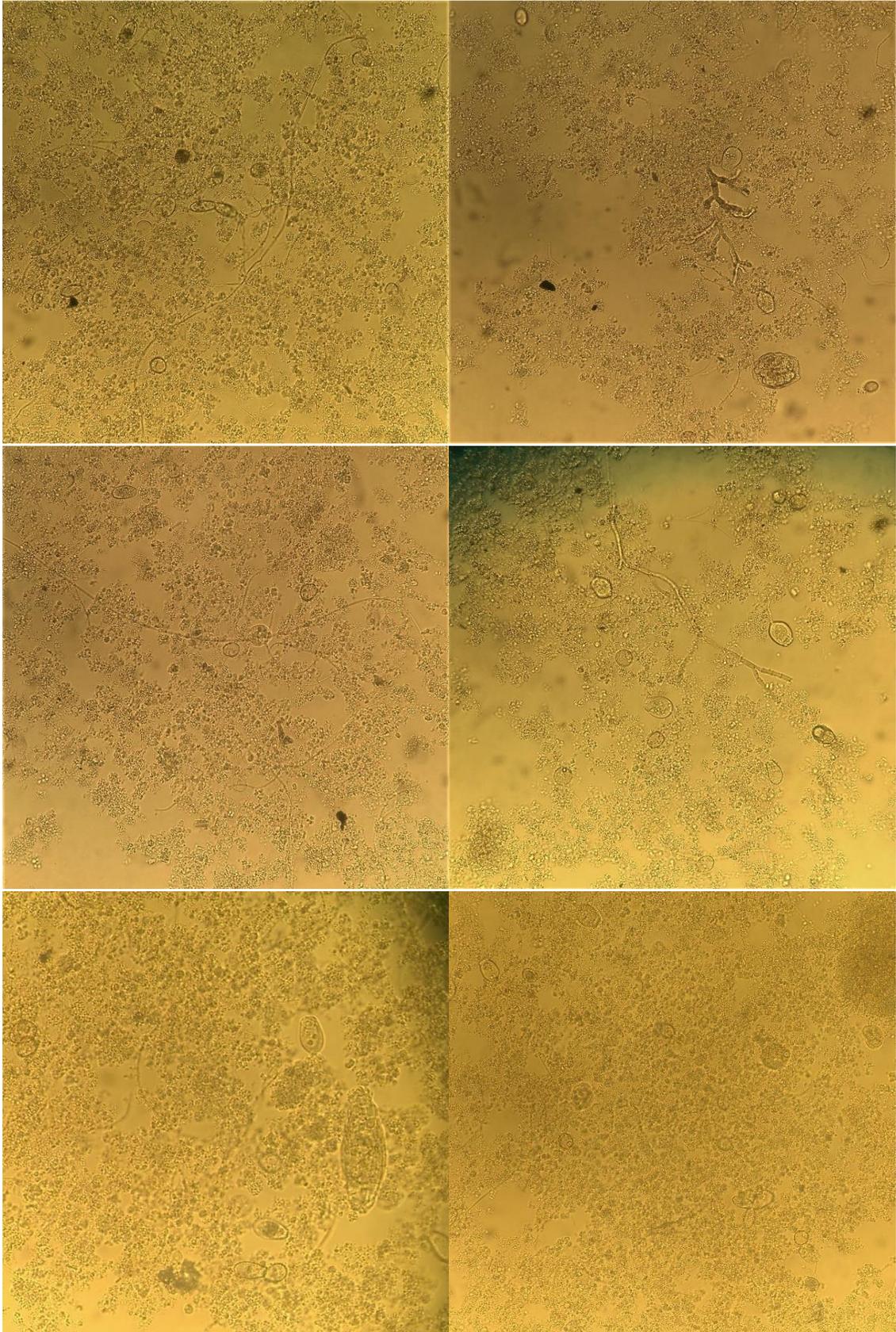


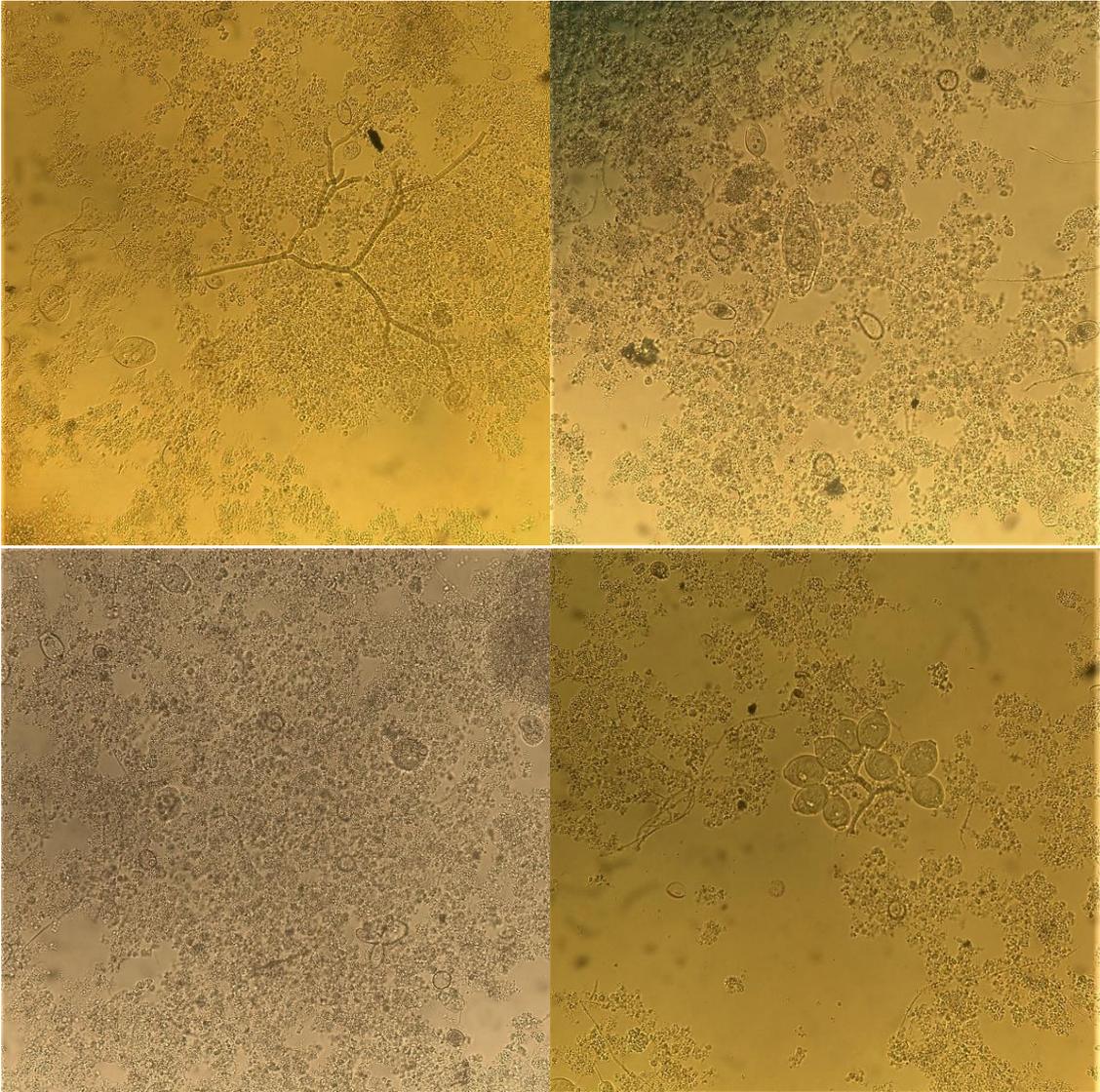


Fecha: 26-4-2017

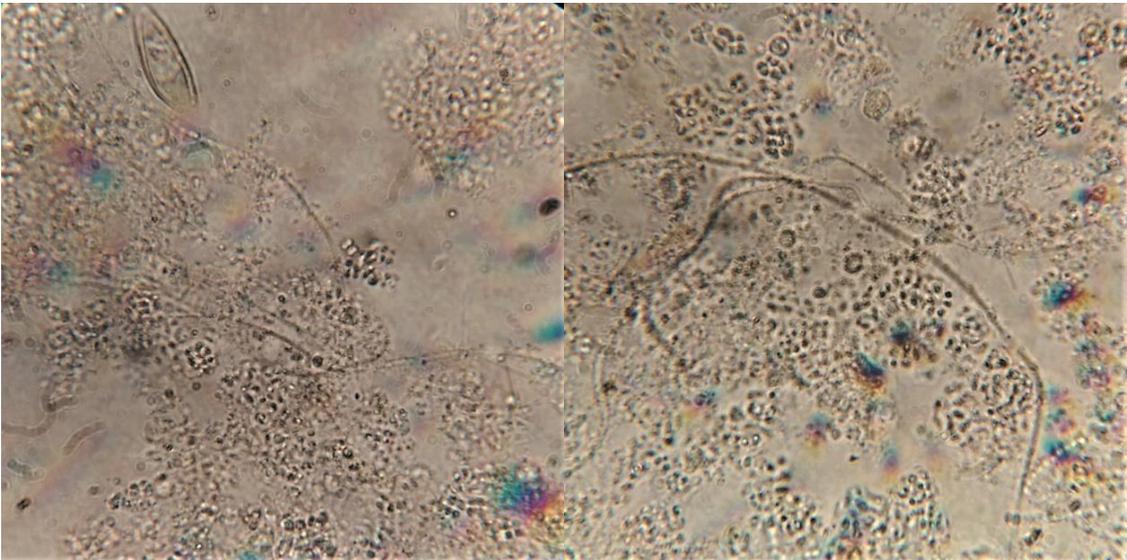
Aumento 40X

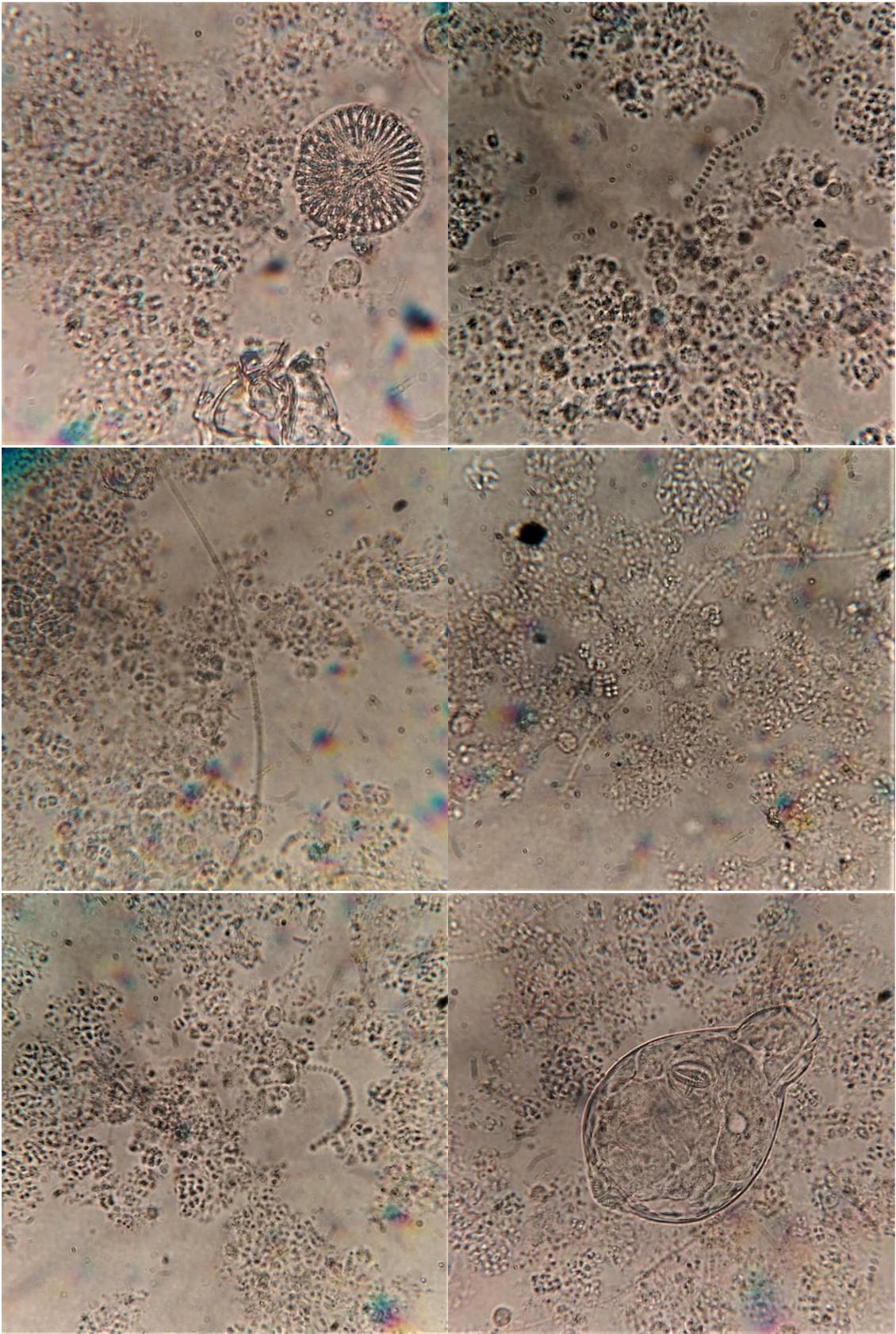


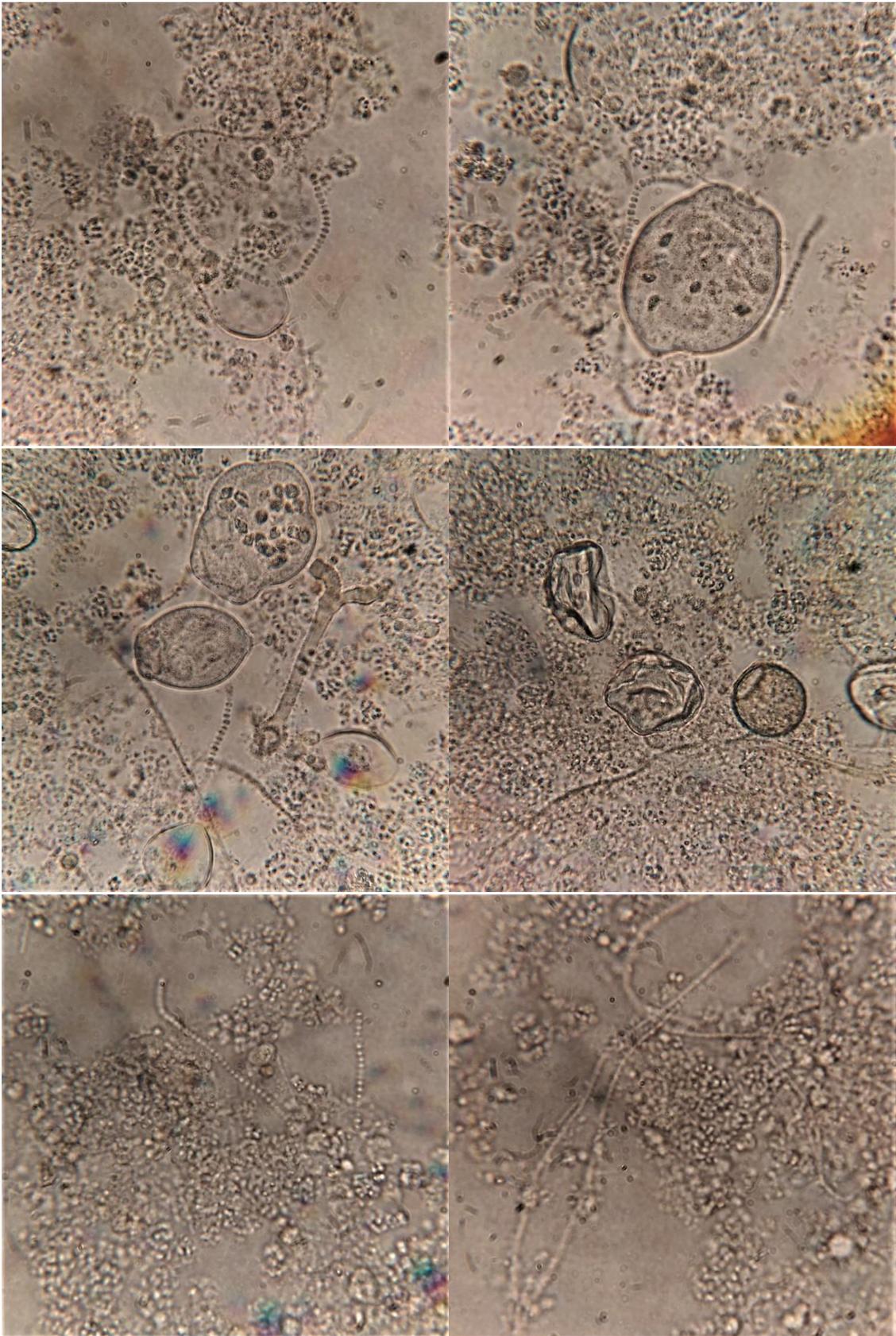




Aumento 100X

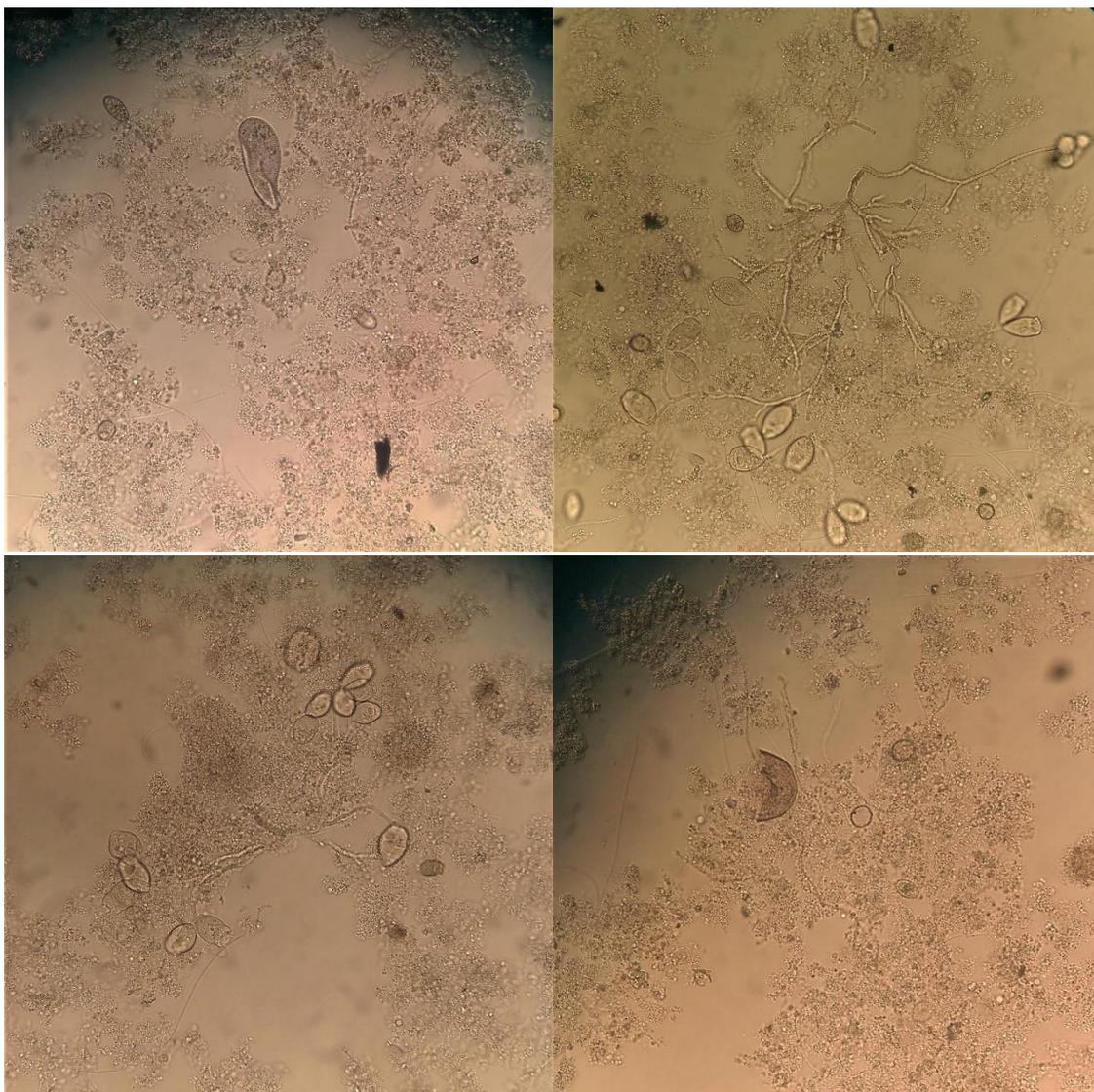






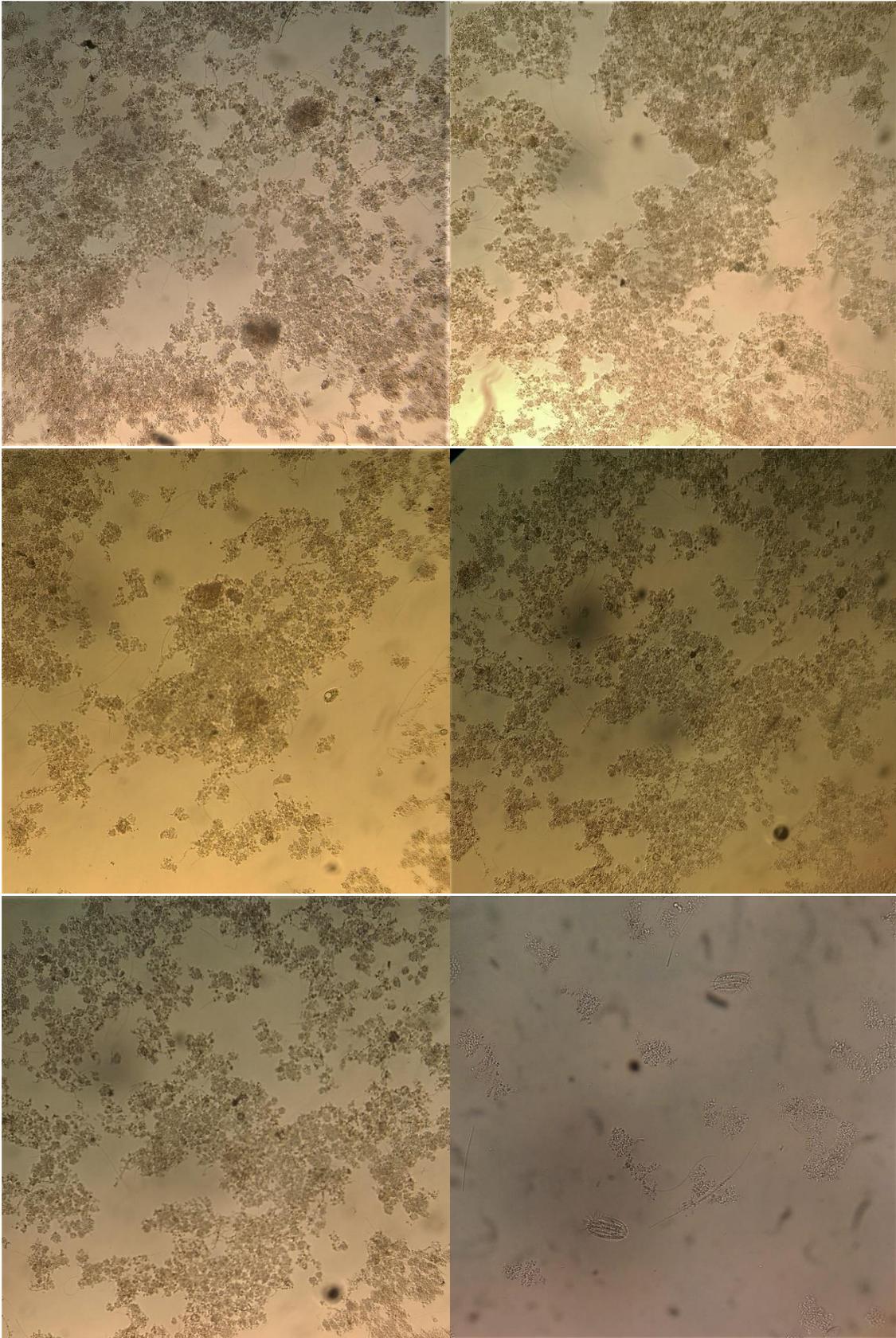
Fecha: 10-5-2017

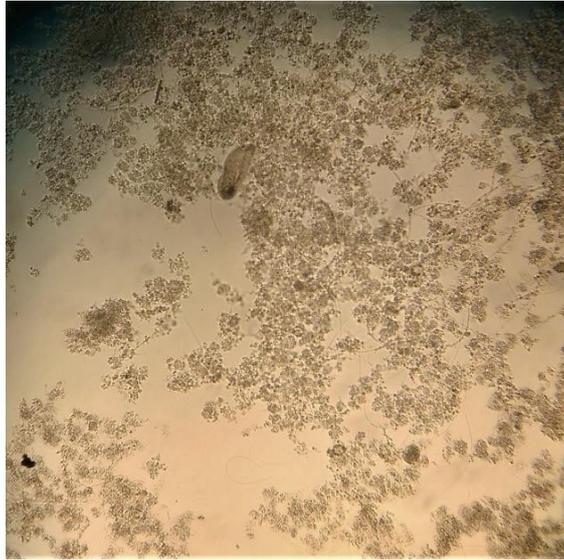
Aumento 40X



Fecha: 24-5-2017

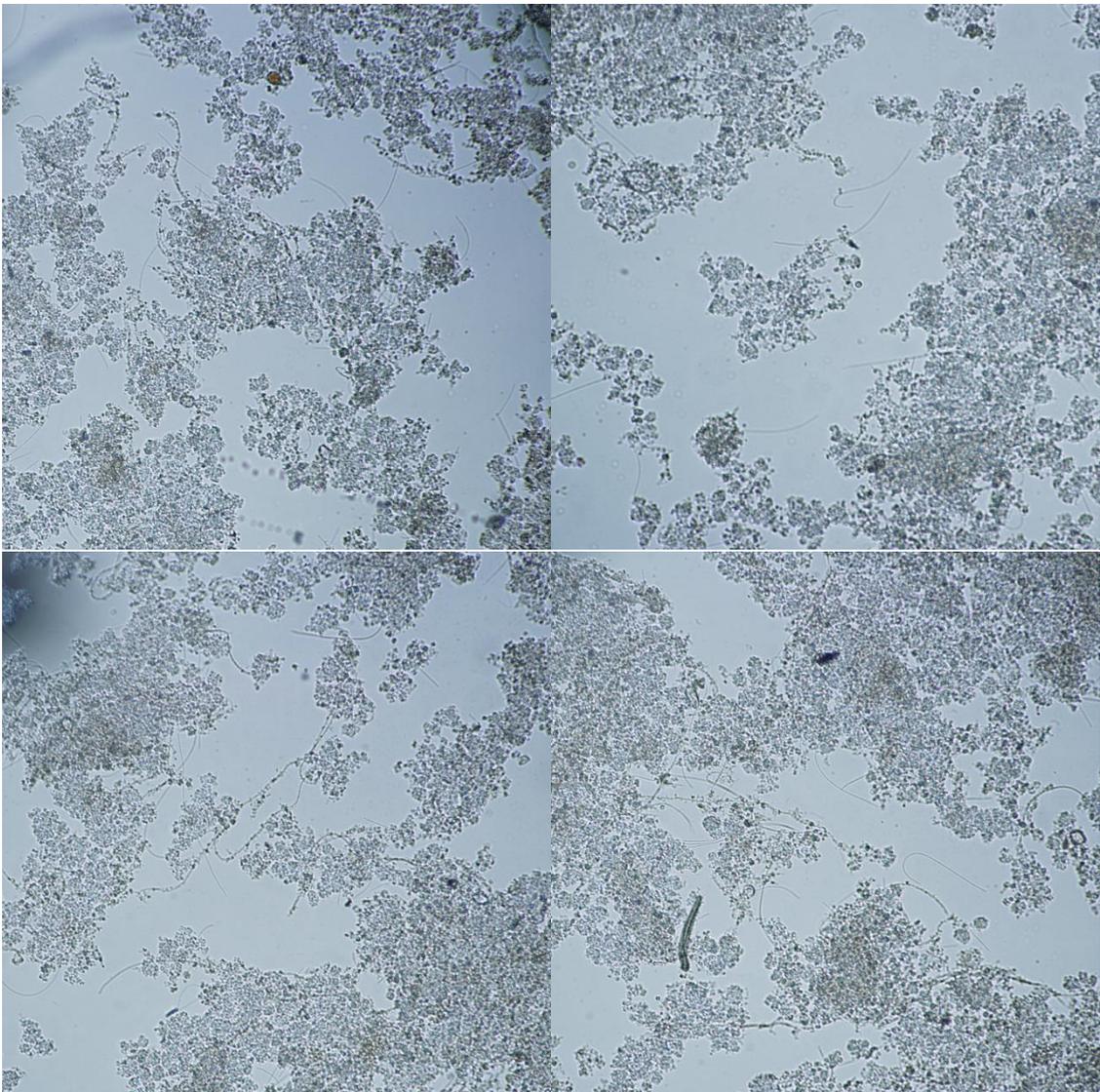
Aumento 40X



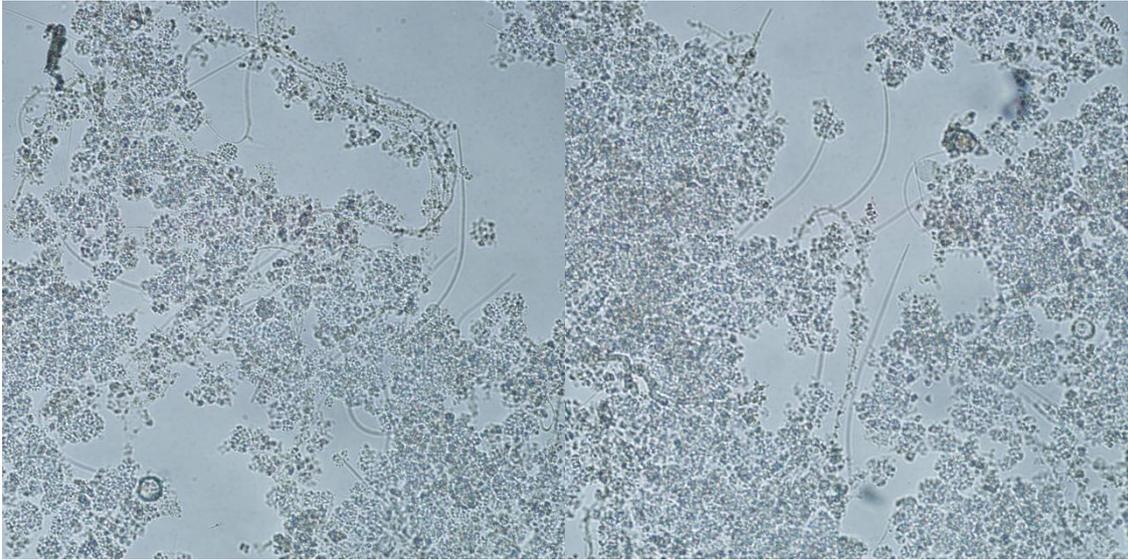


Fecha:15-6-2017

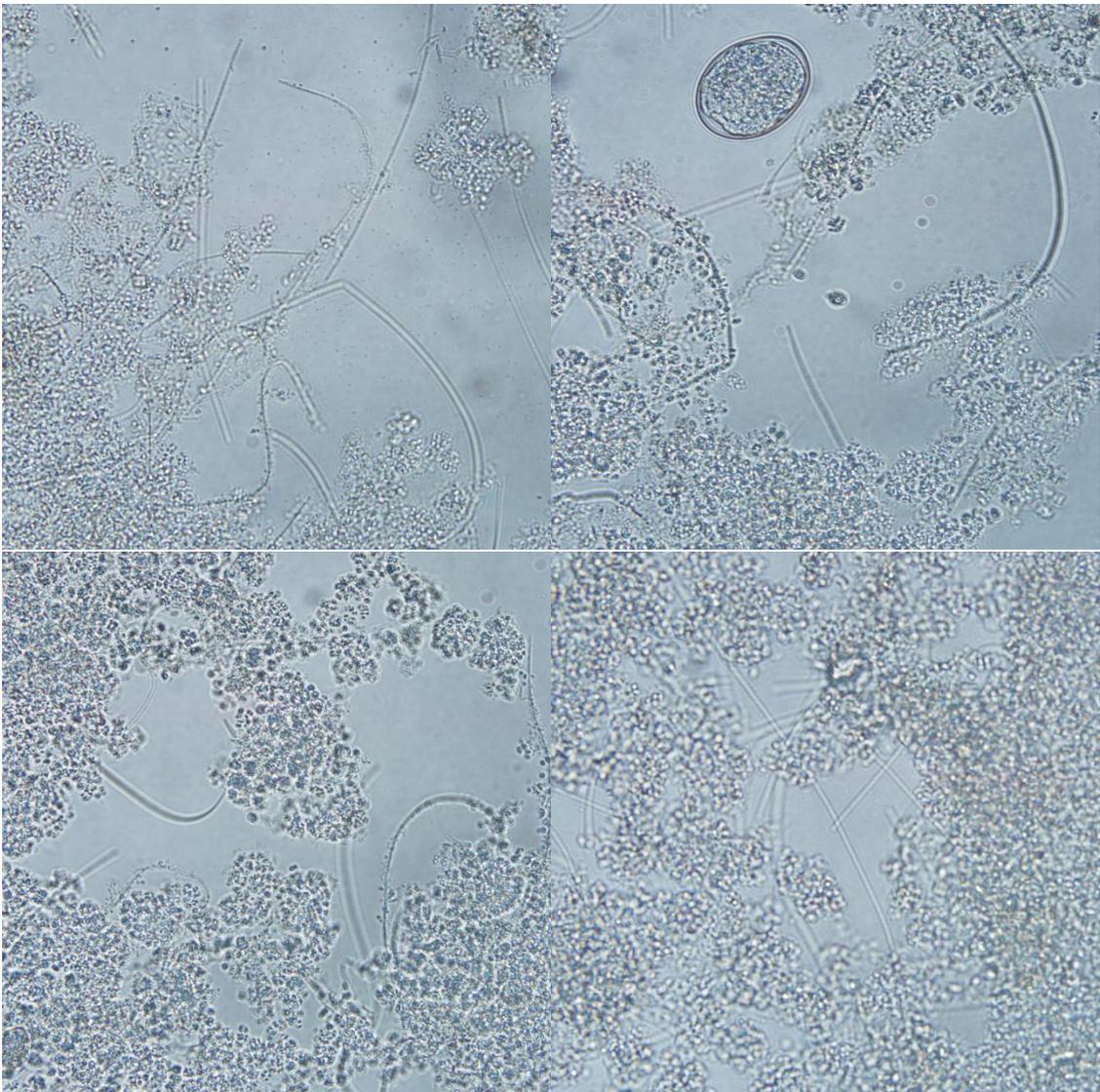
Aumento 10X:



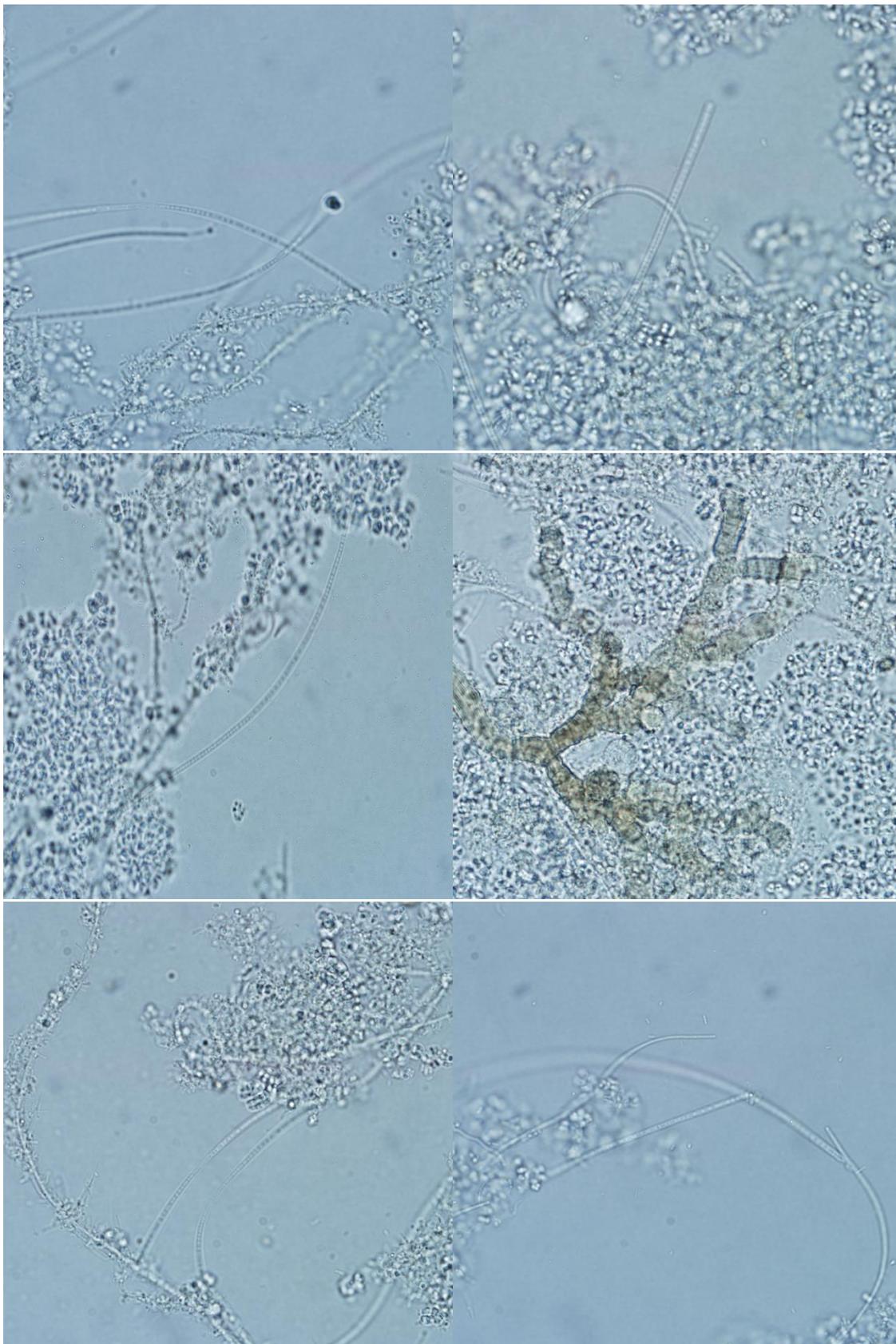
Aumento 20X:



Aumento 40X:

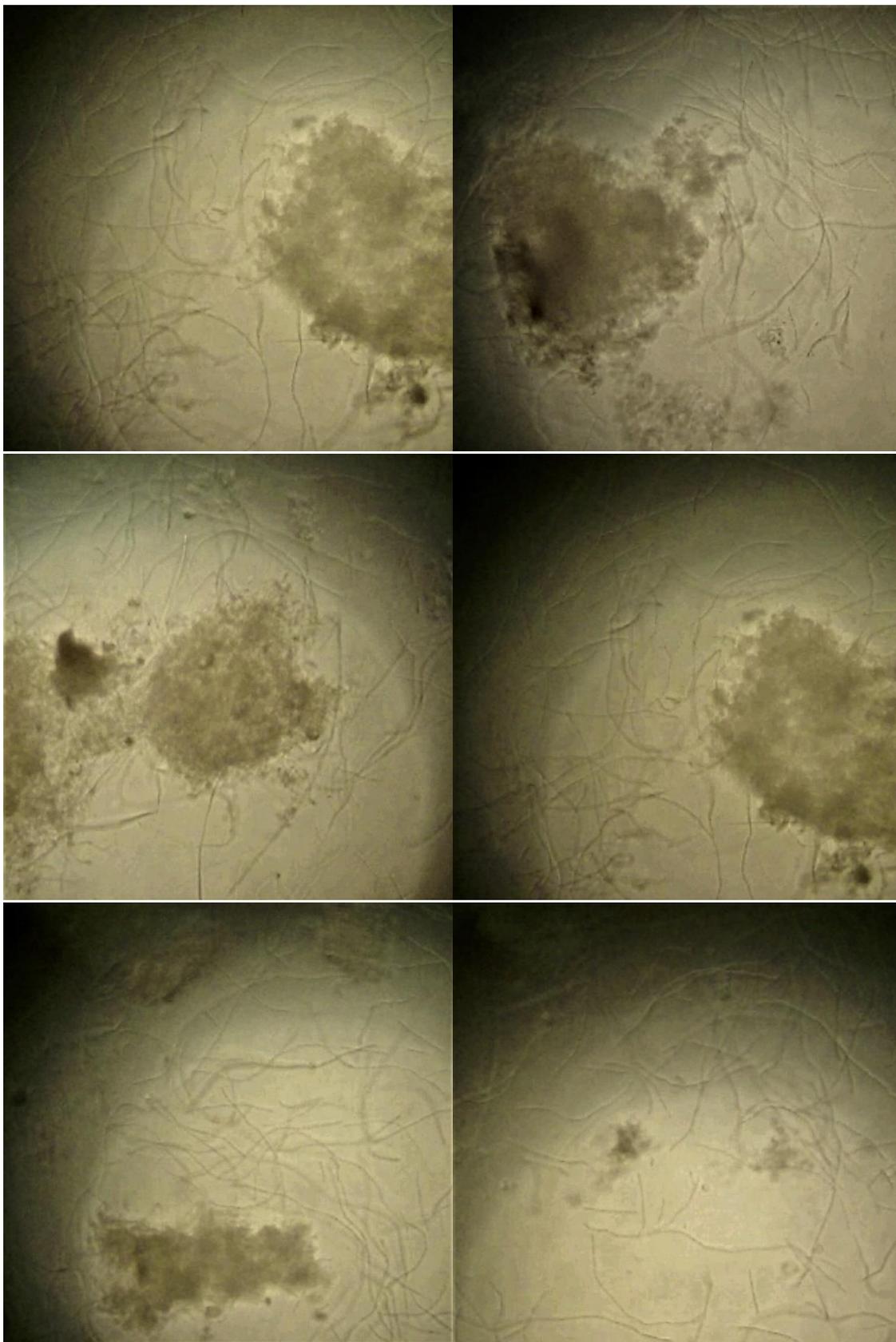


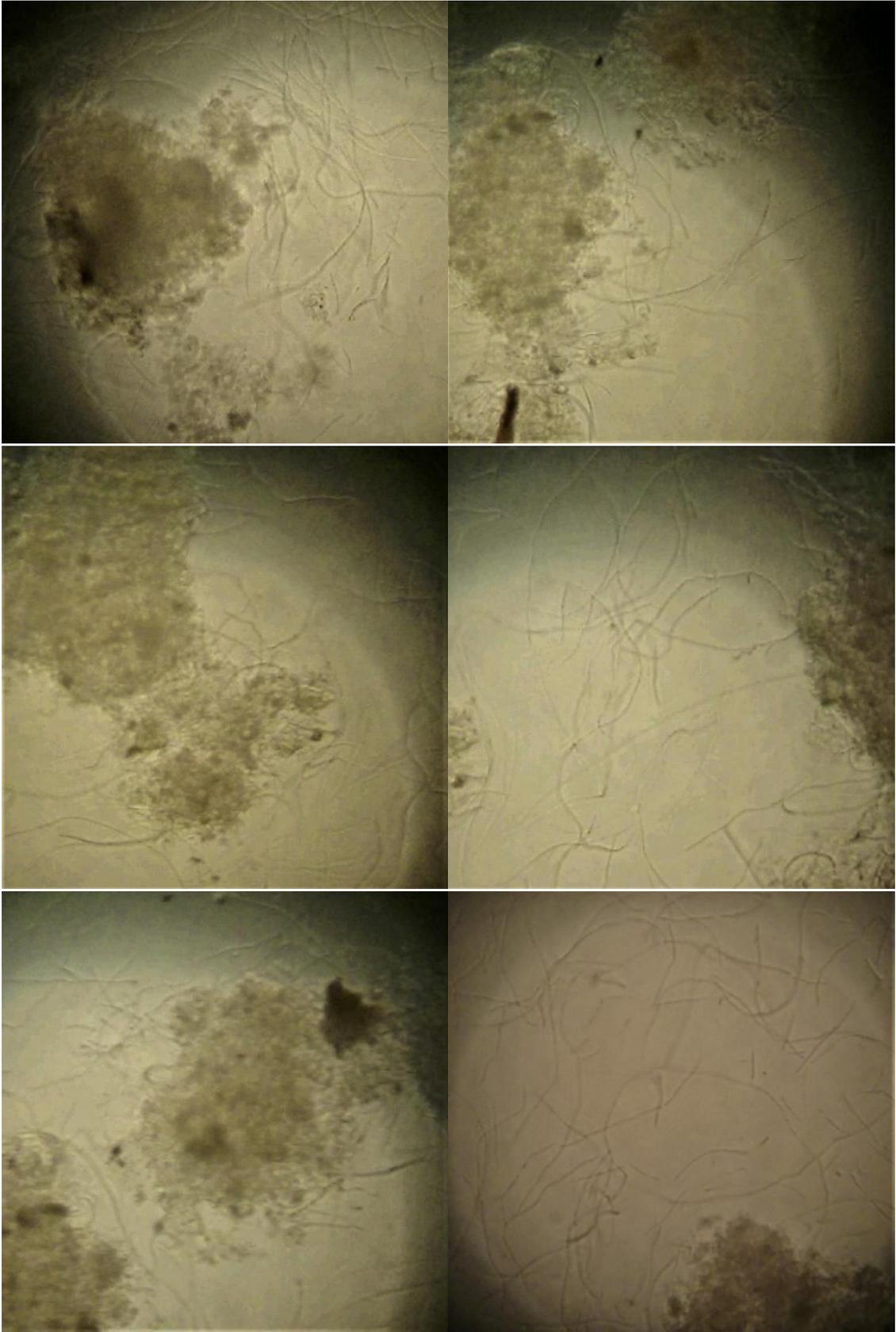
Aumento 100X:



## RESIDUOS HOSPITALARIOS

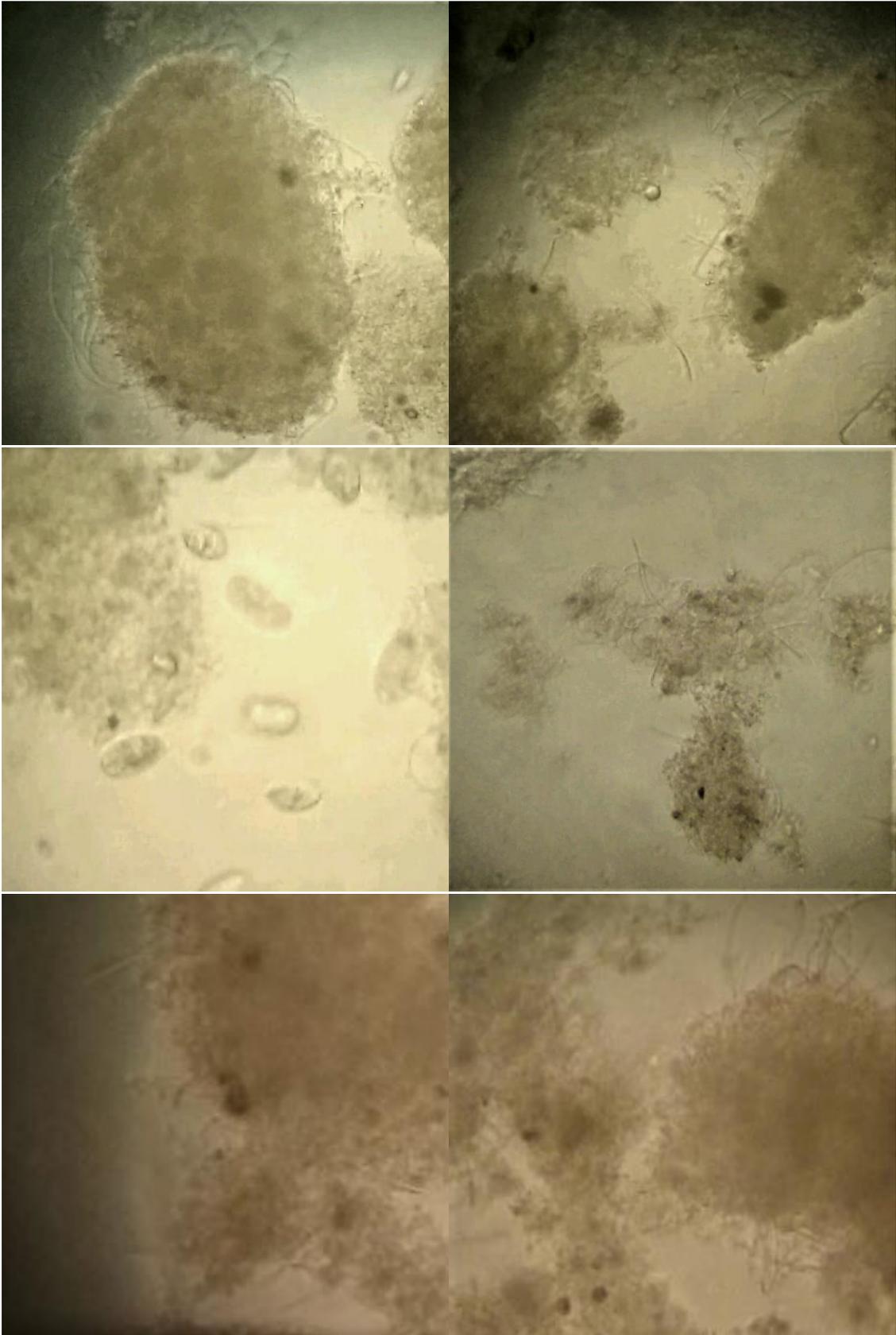
Fecha: 31-5-2016

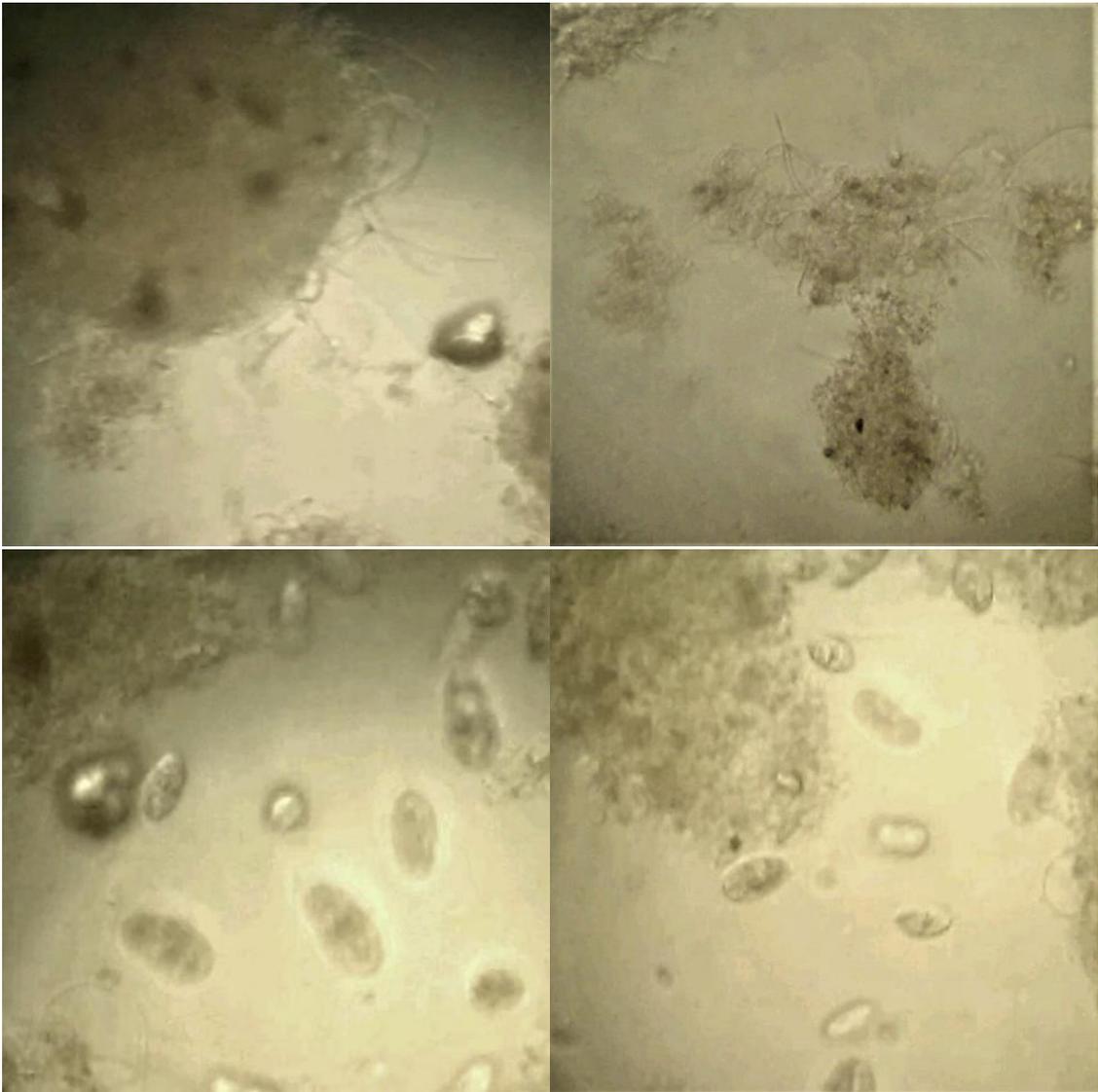




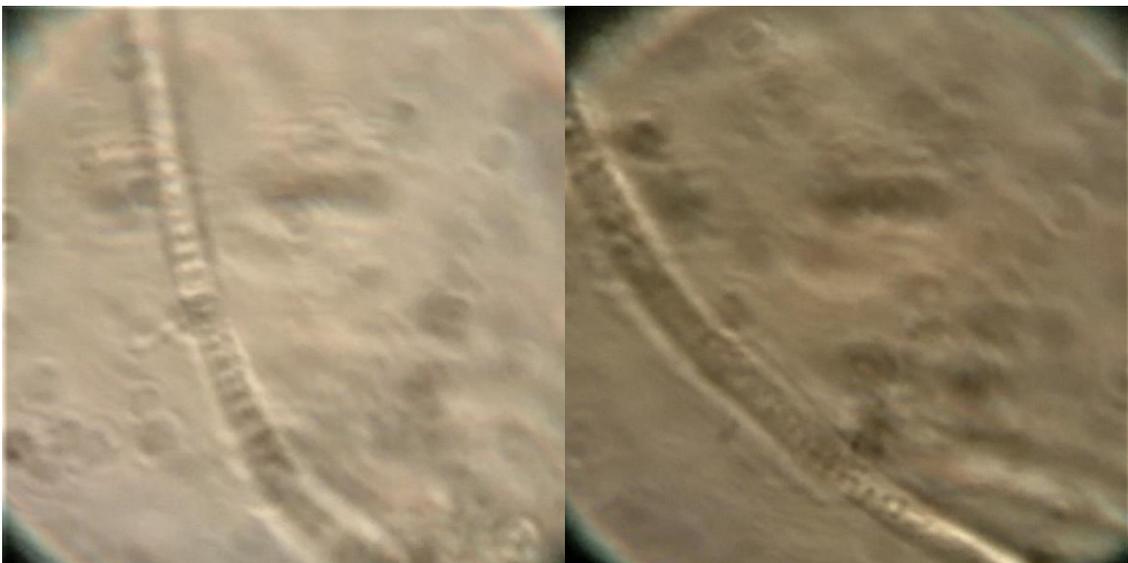
Fecha 10-8-2016

Aumento 40X



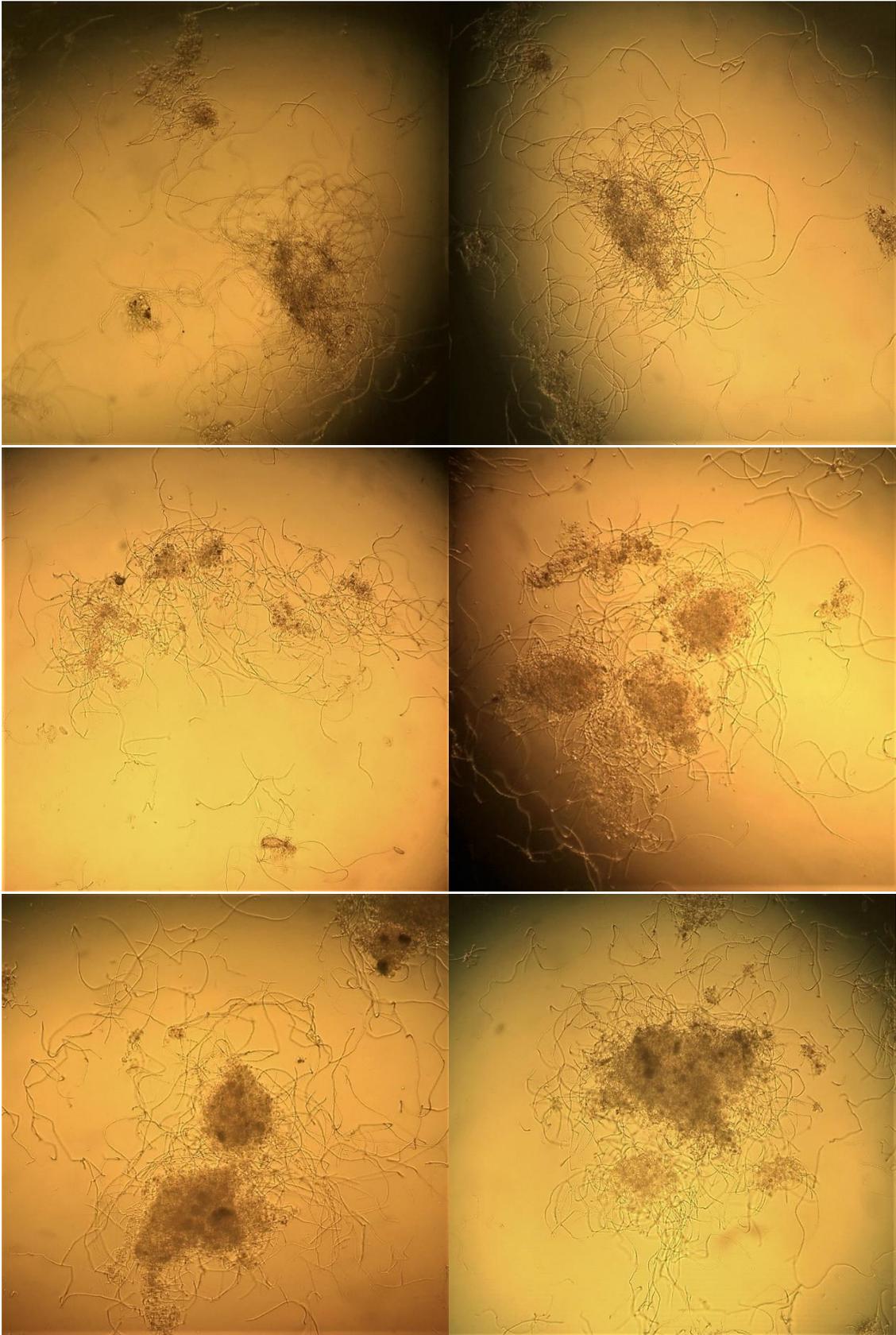


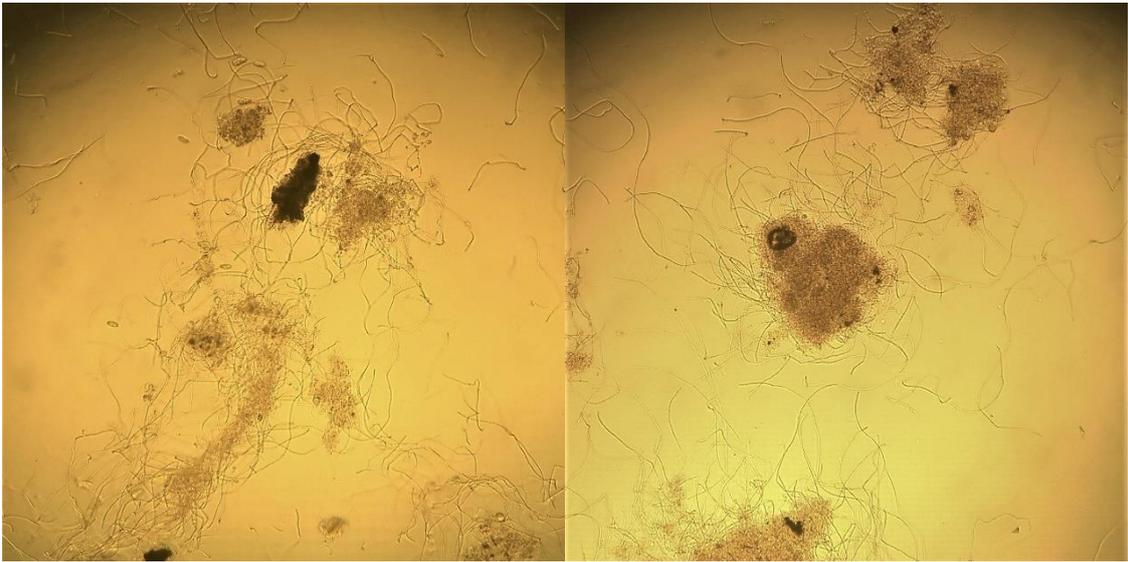
Aumento 100X



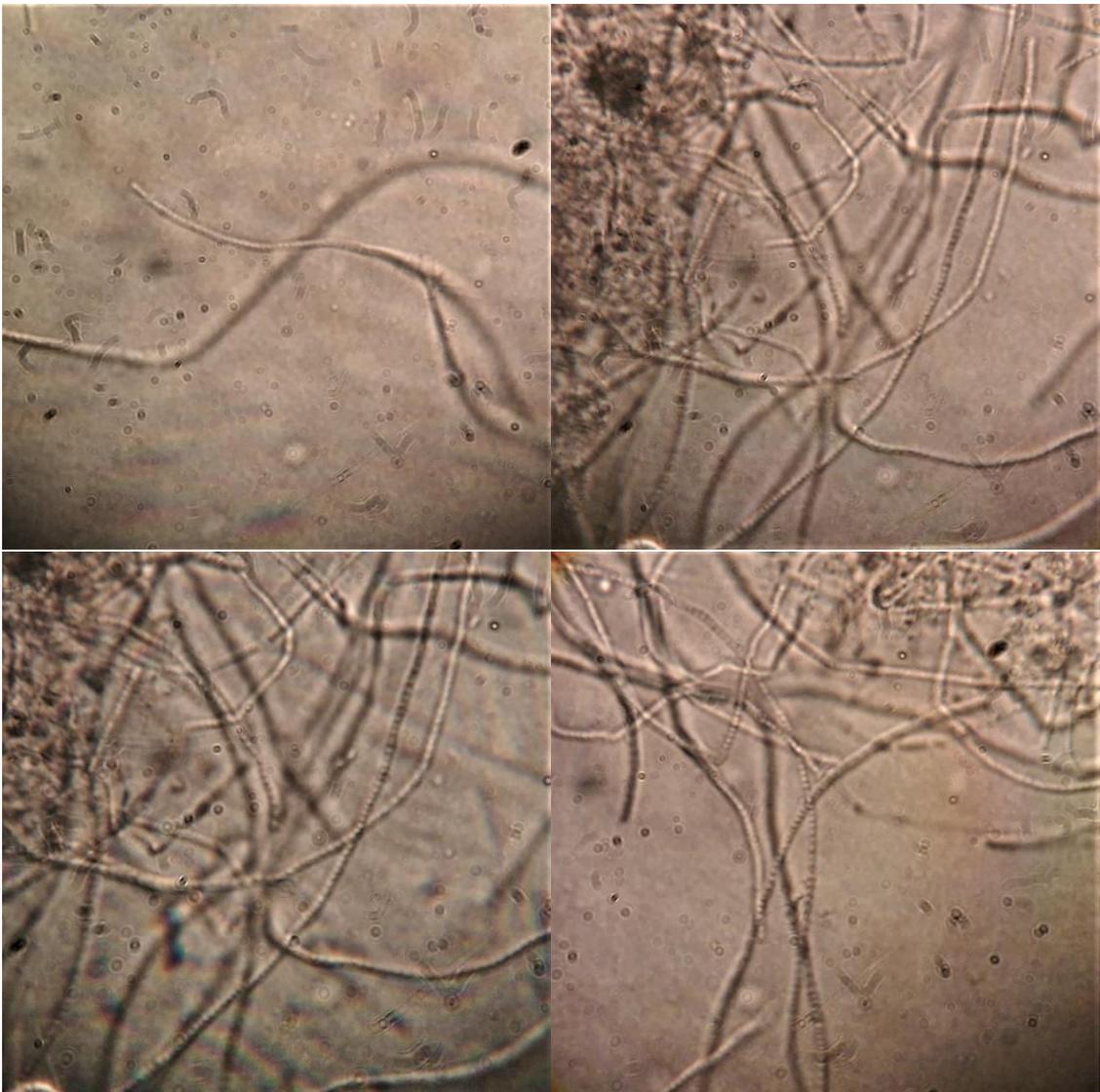
Fecha: 1-9-2016

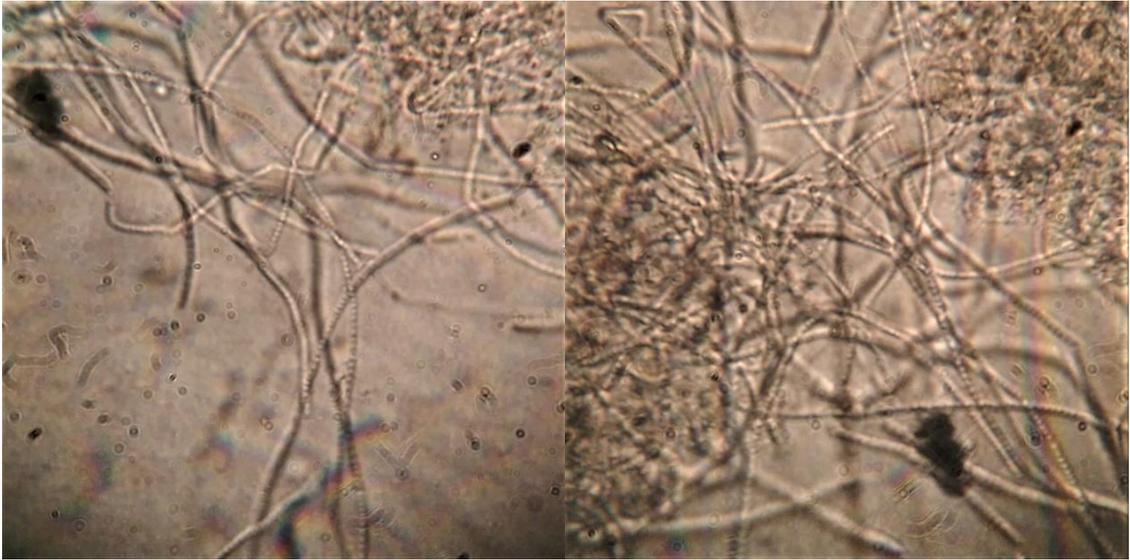
Aumento 40X





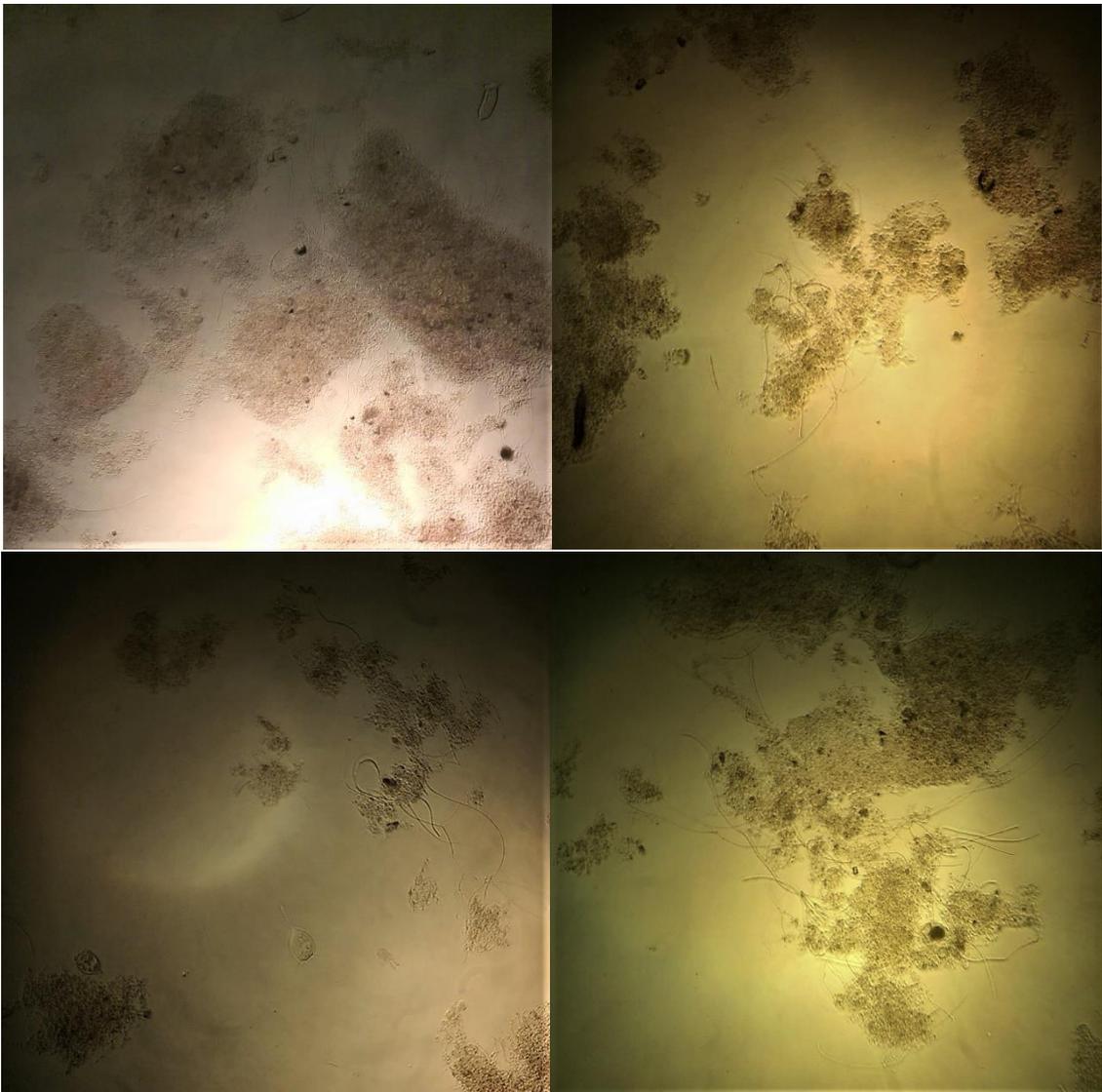
Aumento 100X

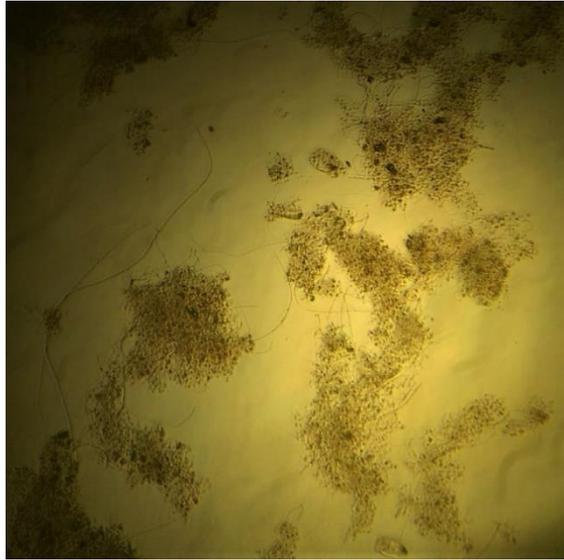




Fecha: 19-9-2016

Aumento 40X



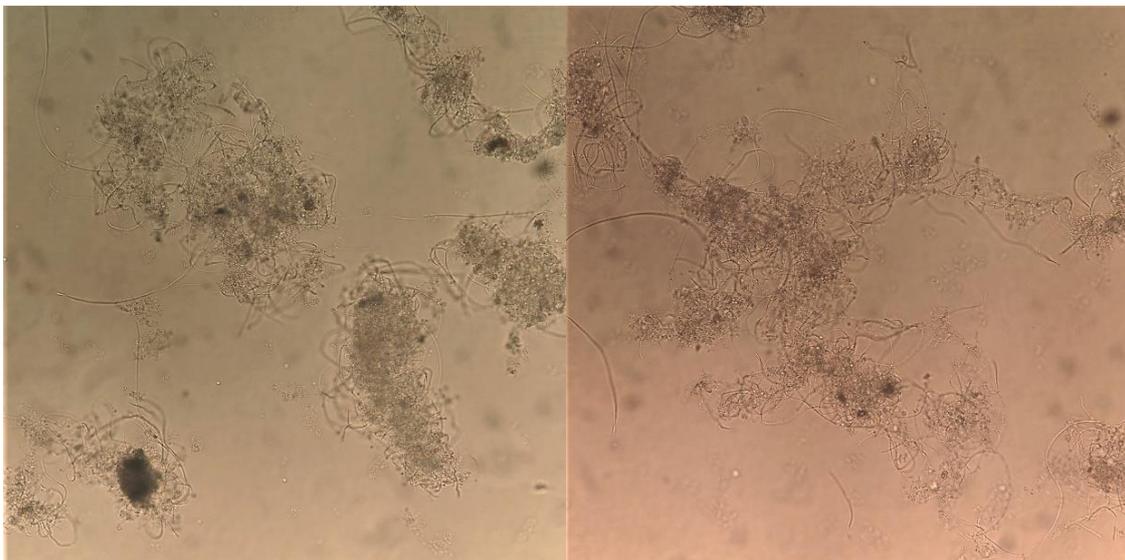


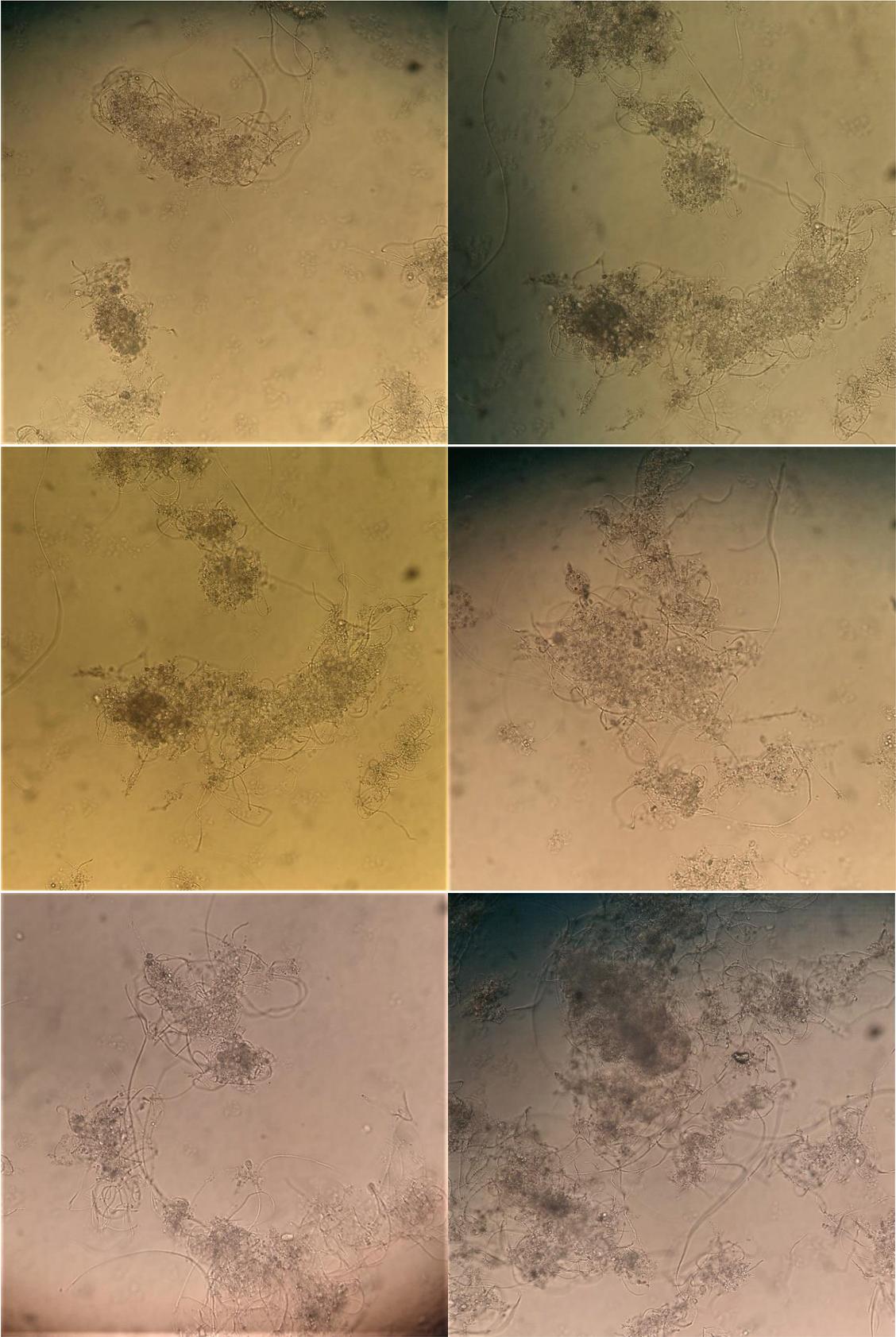
Aumento 100X

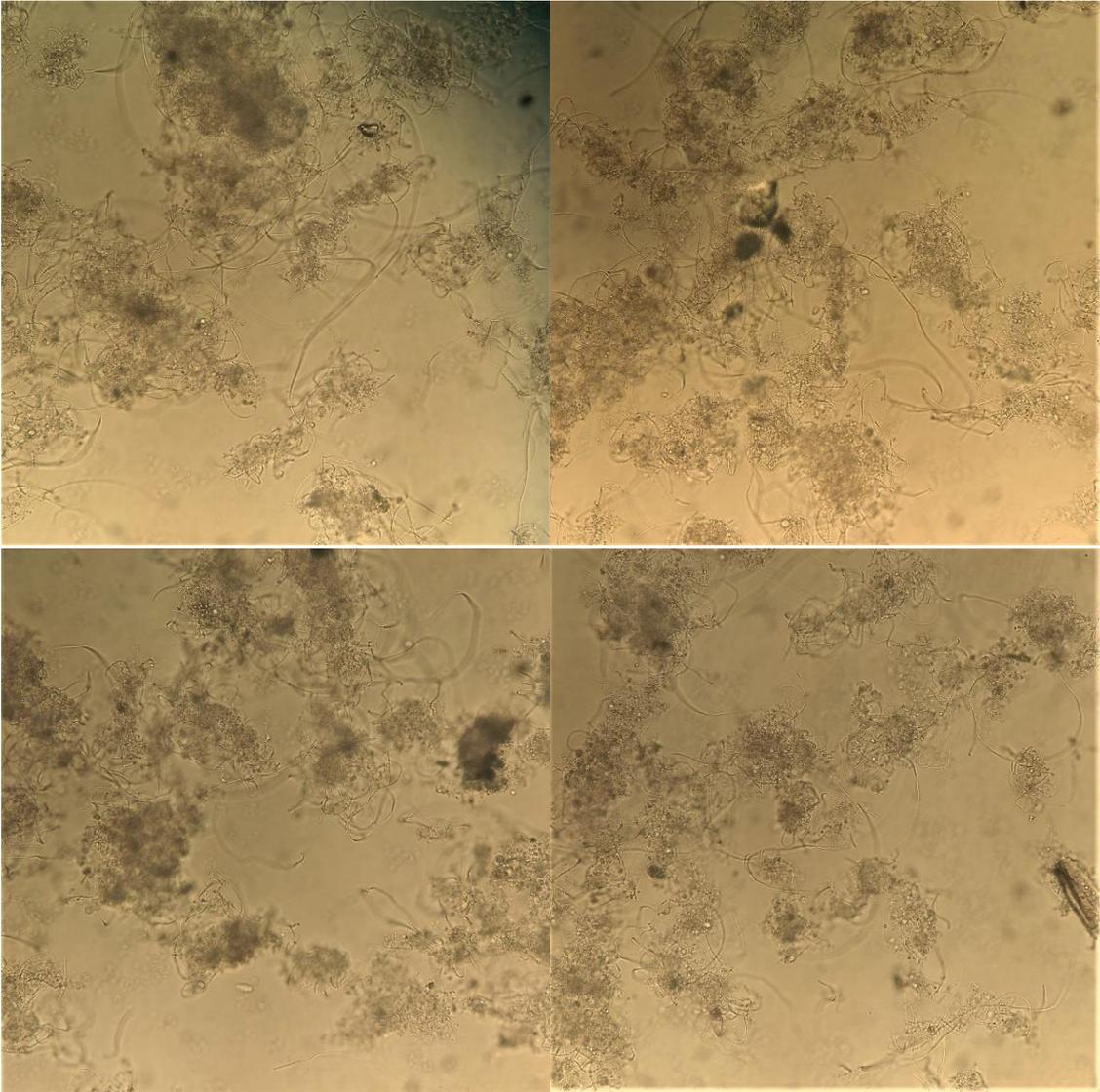


Fecha: 26-10-2016

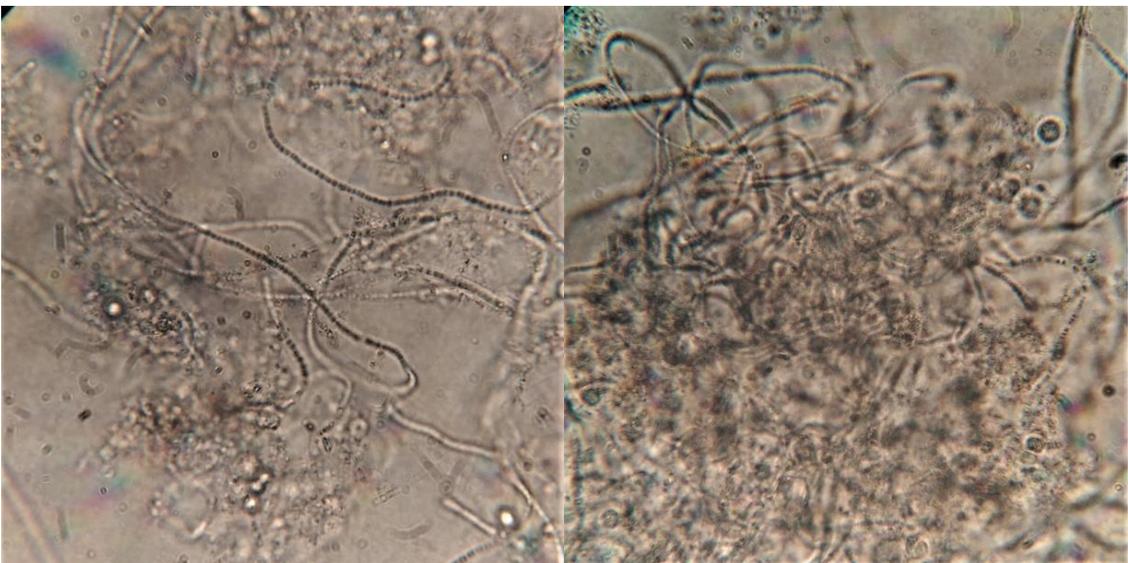
Aumento 40X

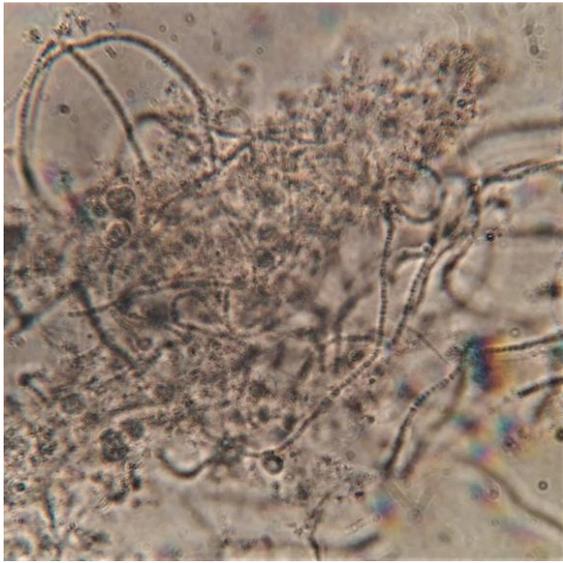
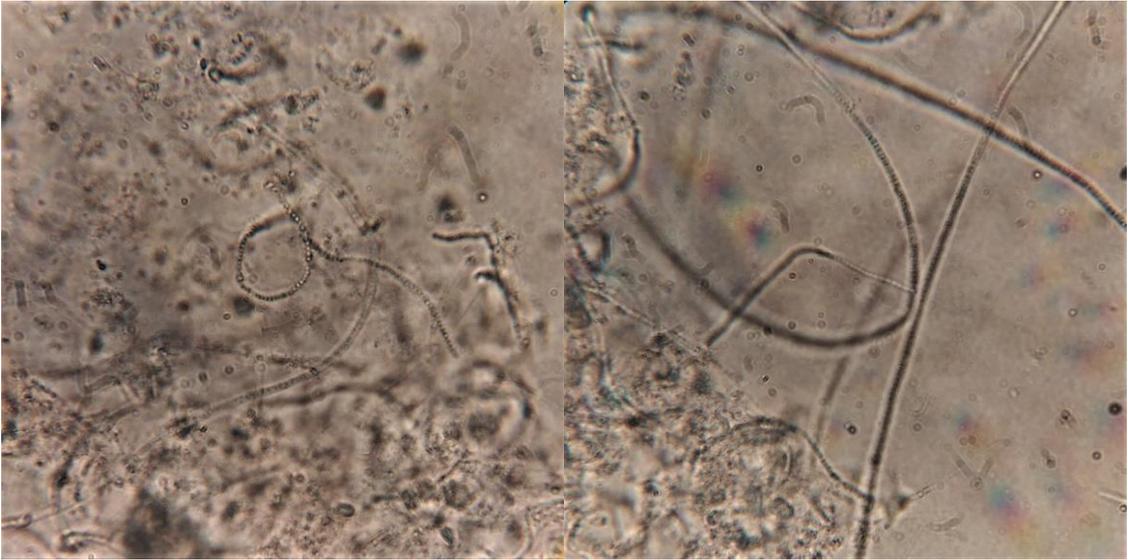






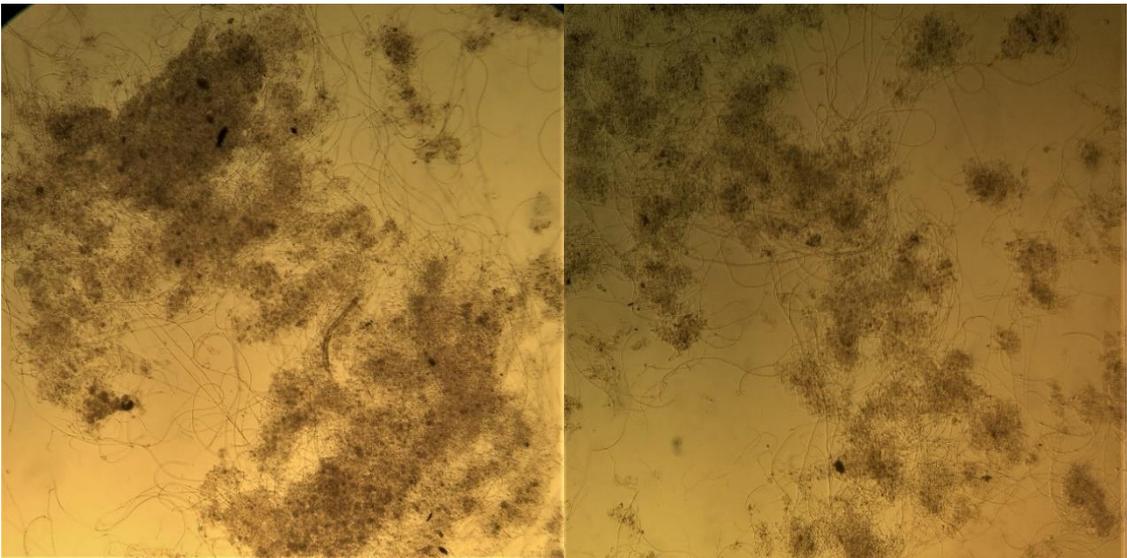
Aumento 100X

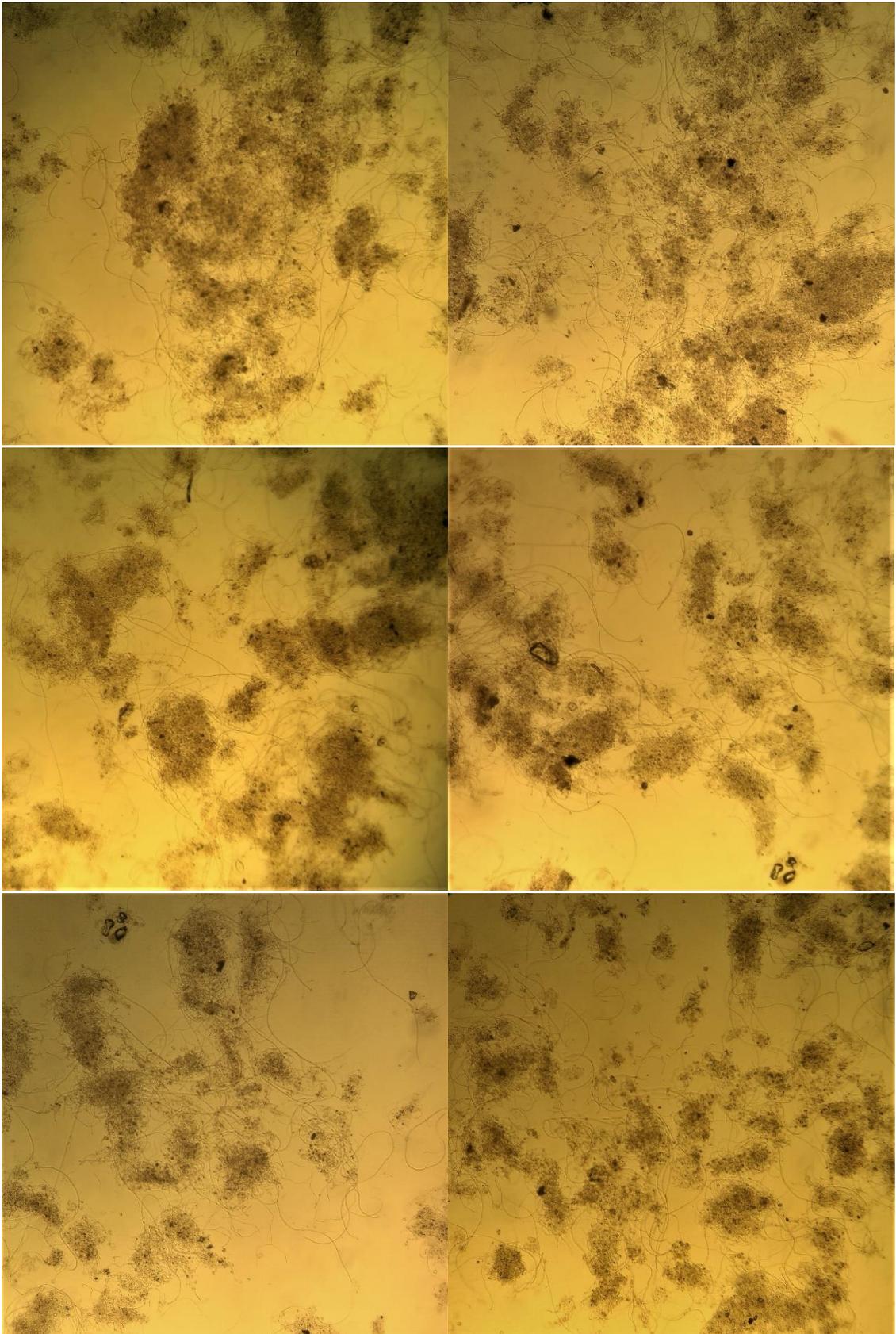


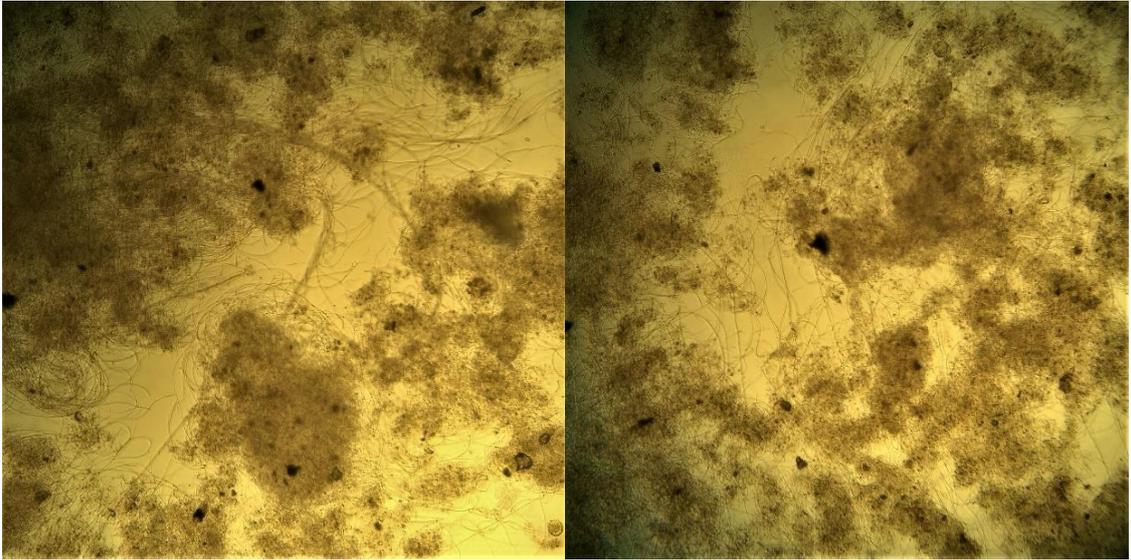


Fecha: 10-5-2017

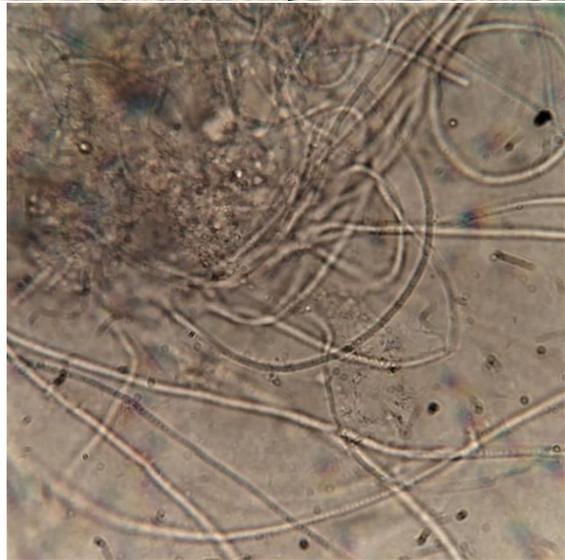
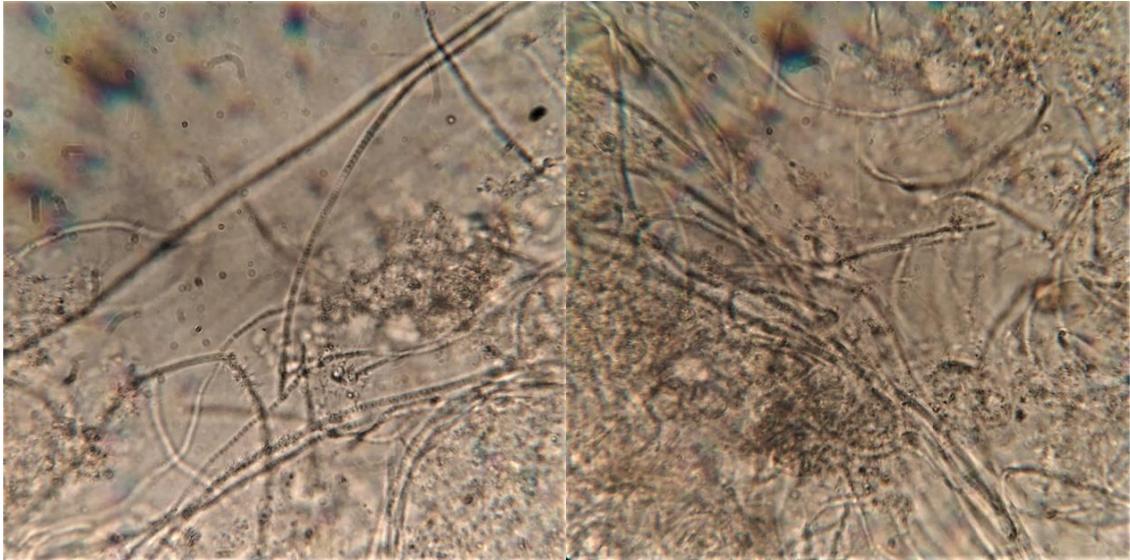
Aumento 40X





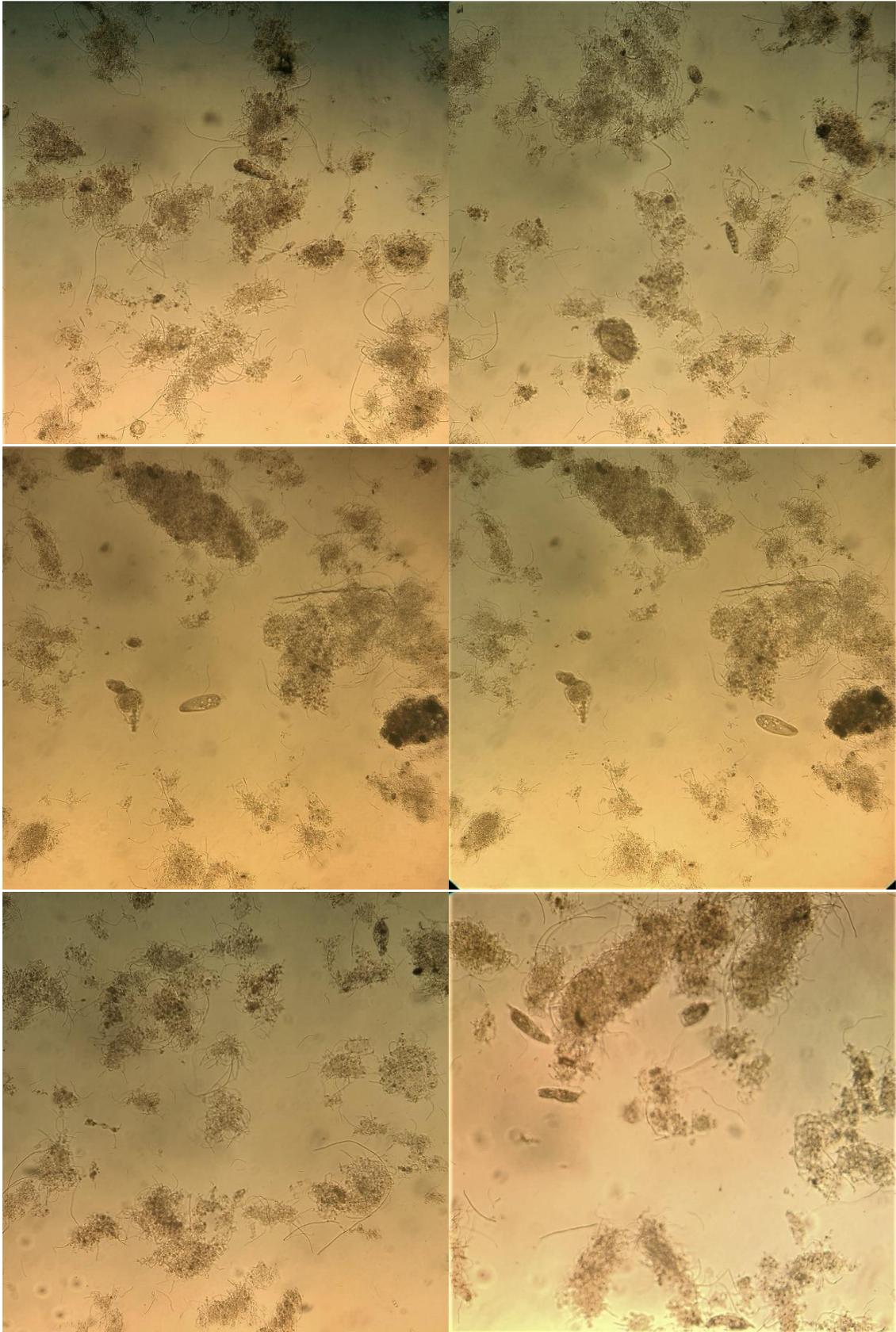


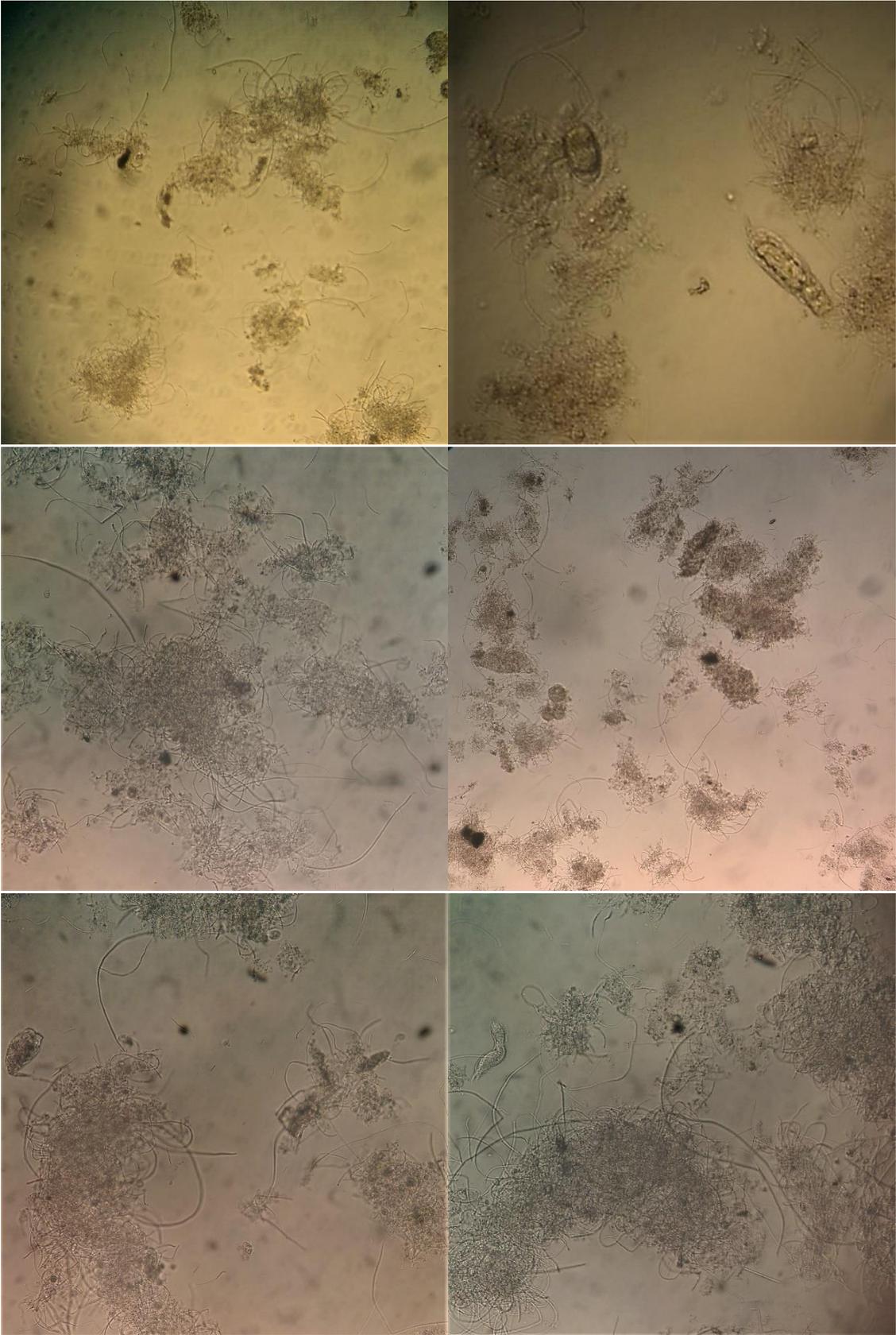
Aumento 100X

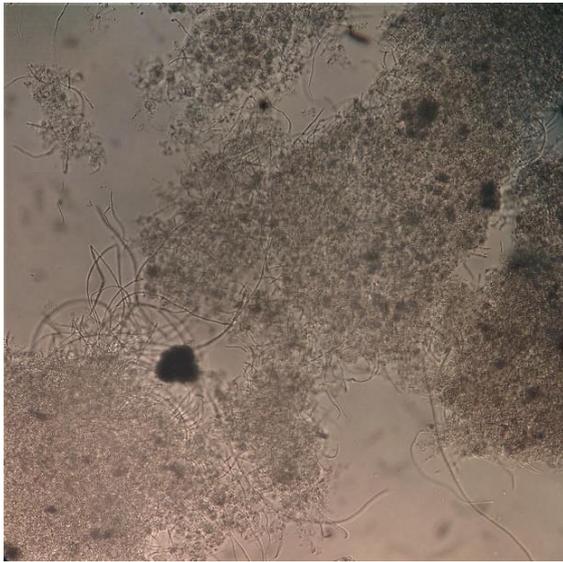


Fecha: 24-5-2017

Aumento 40X

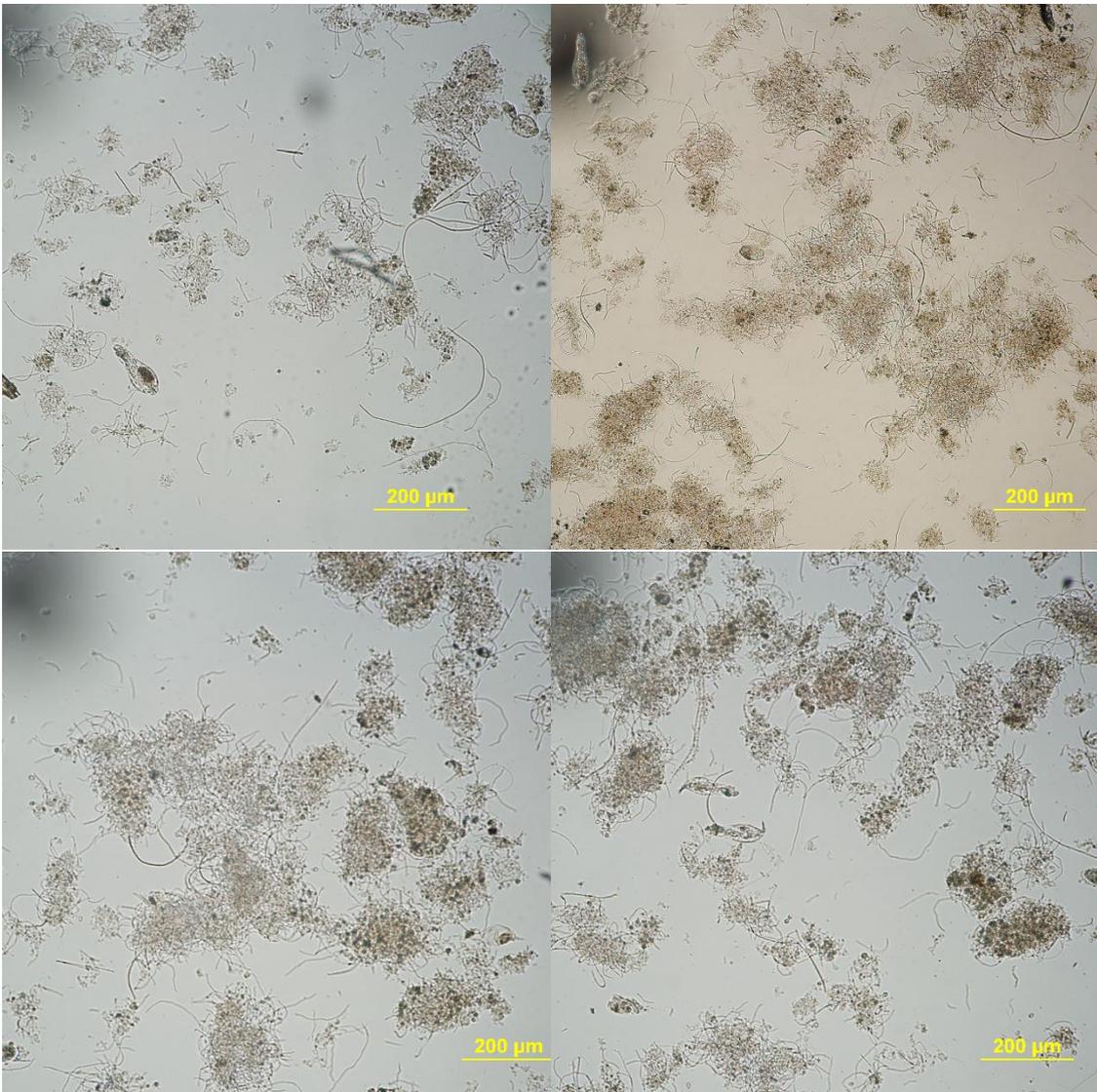




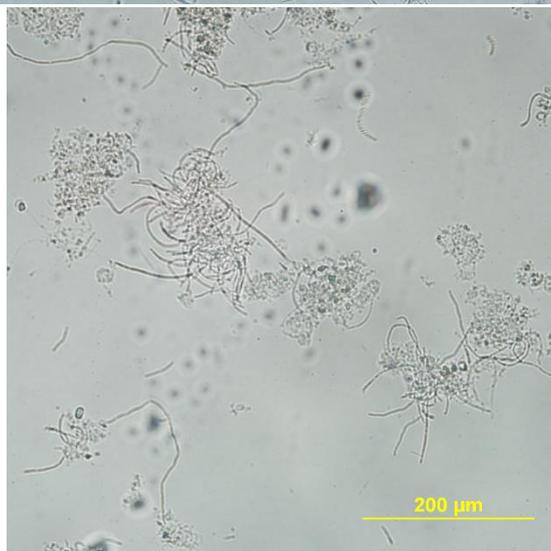
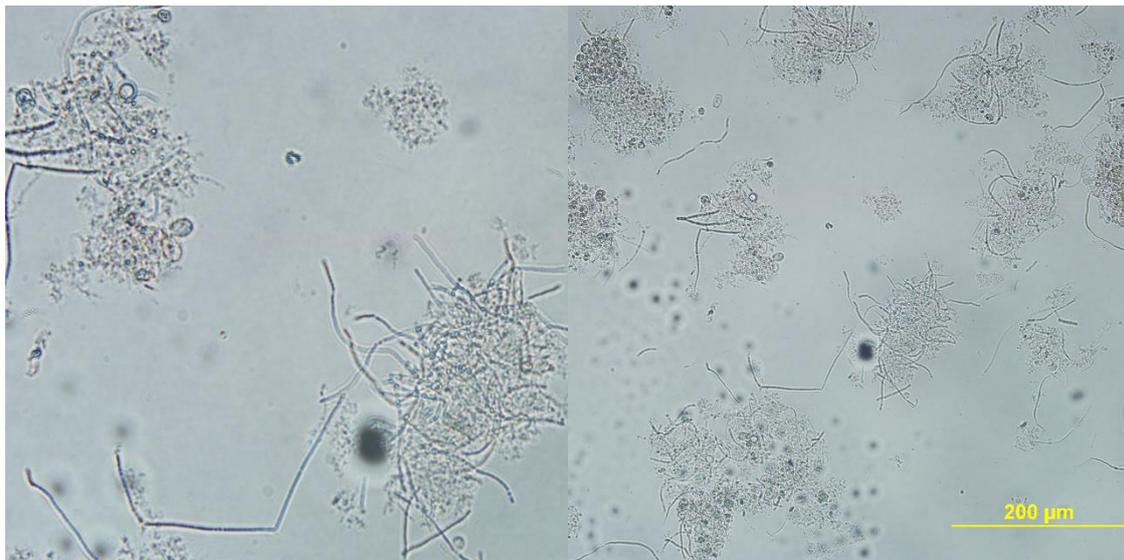


Fecha 15-6-2017

Aumento 10X



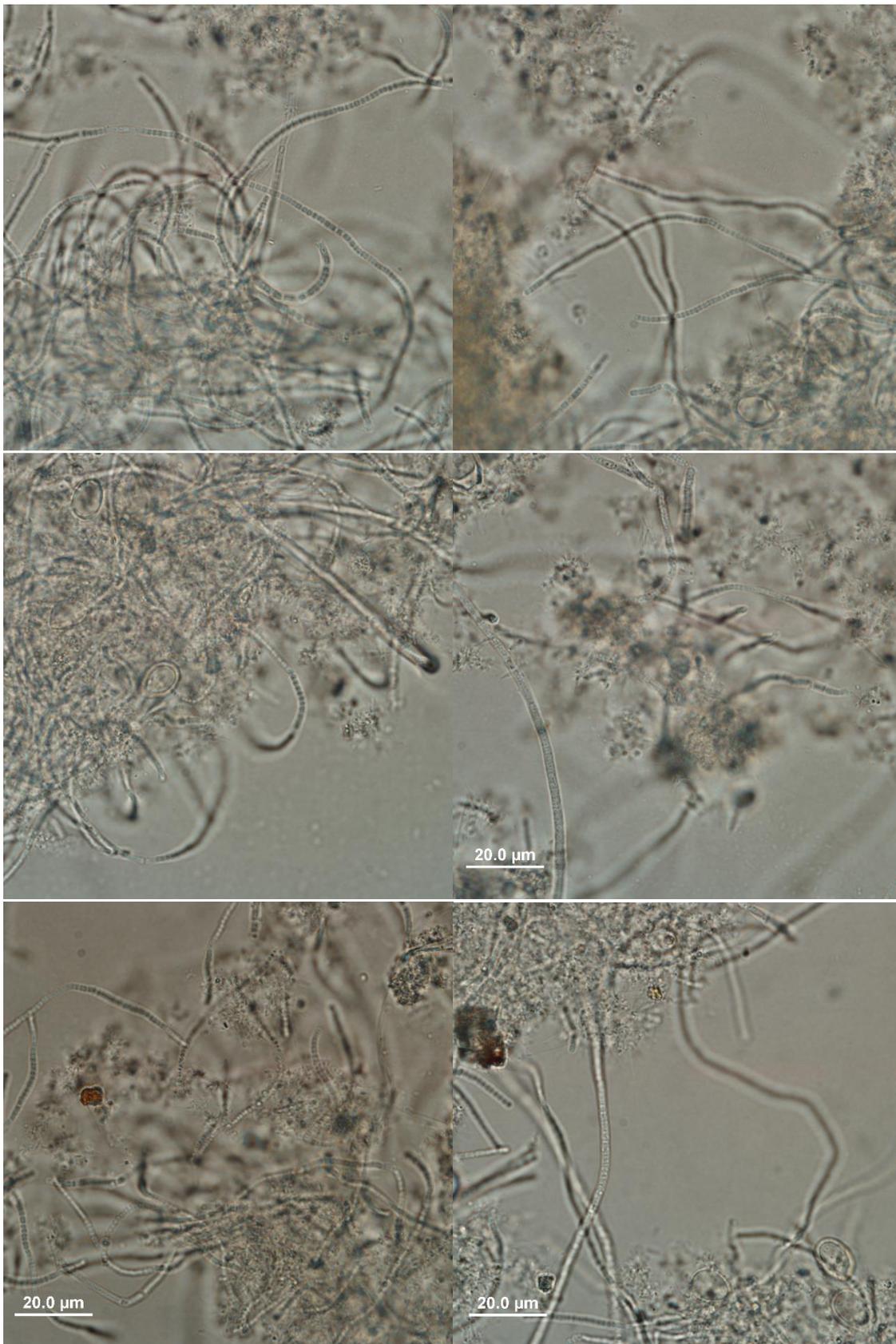
Aumento 20X:



Aumento 40X:



Aumento 100X:

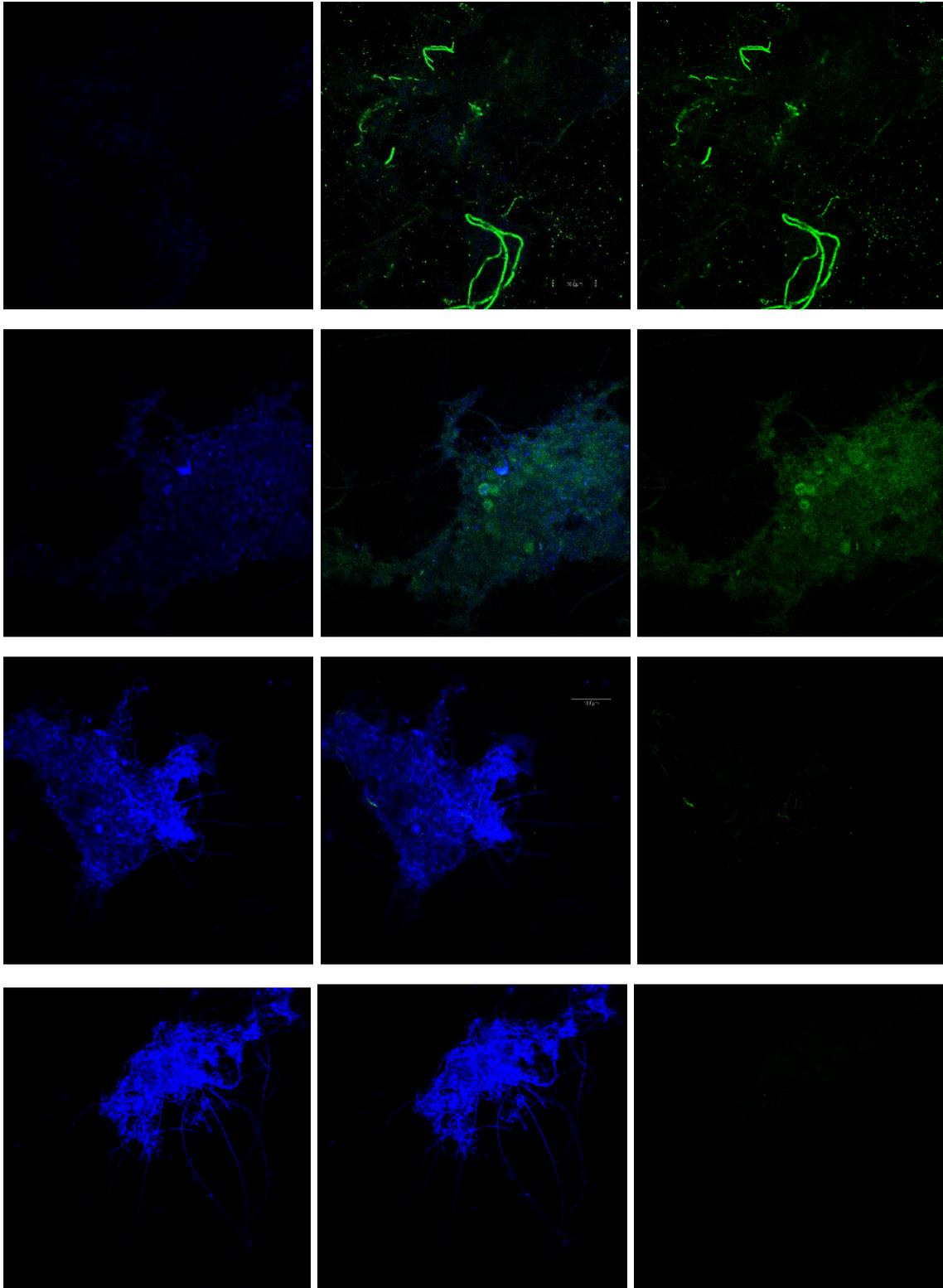


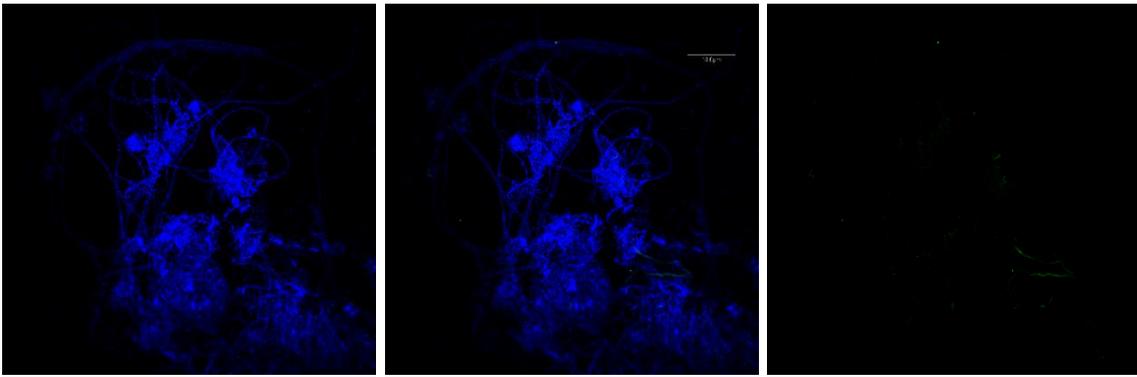
**ANEXO 8**

**MALTERÍA**

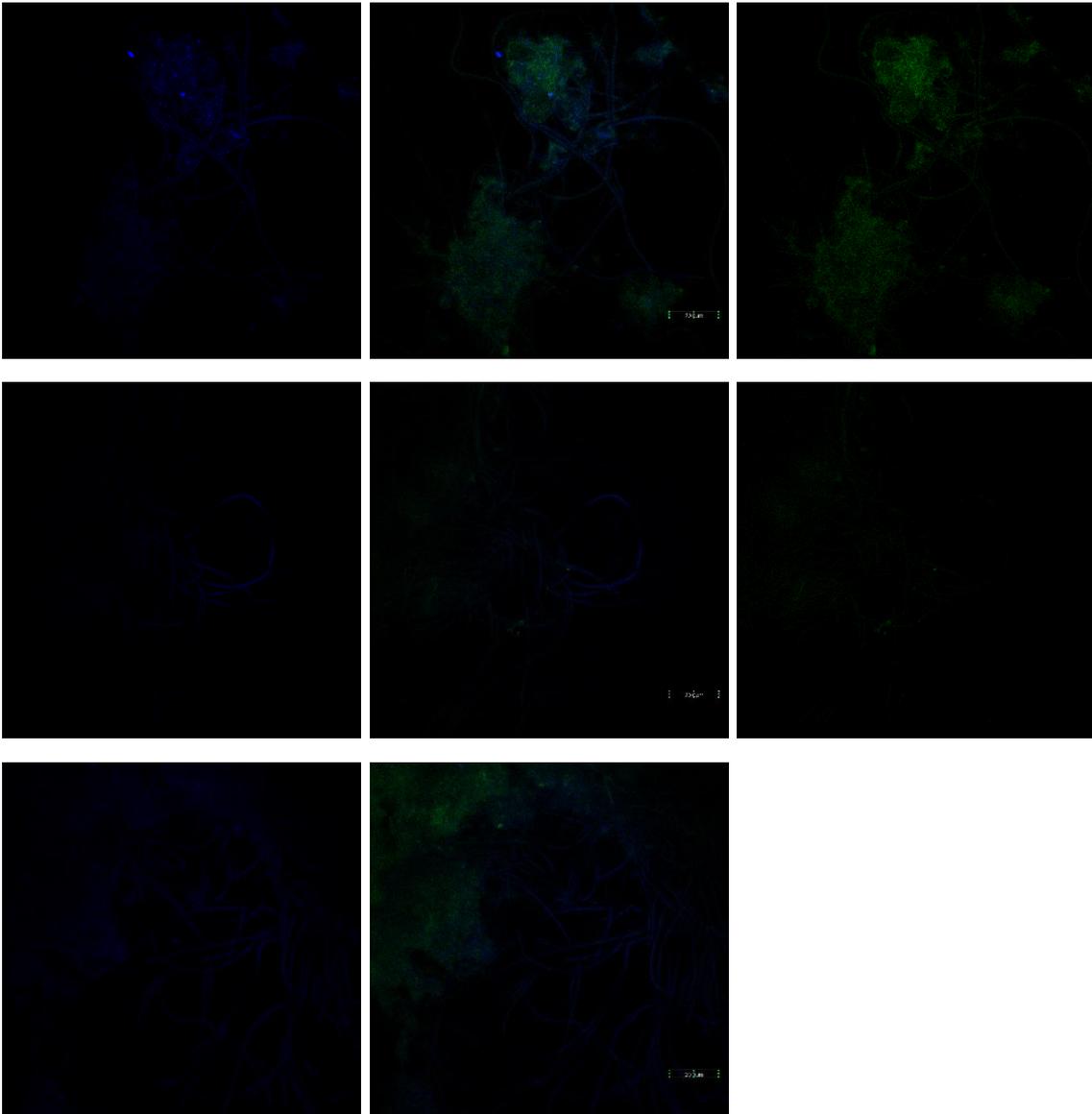
Fecha: 8-8-2016

Muestras fijadas con PFA



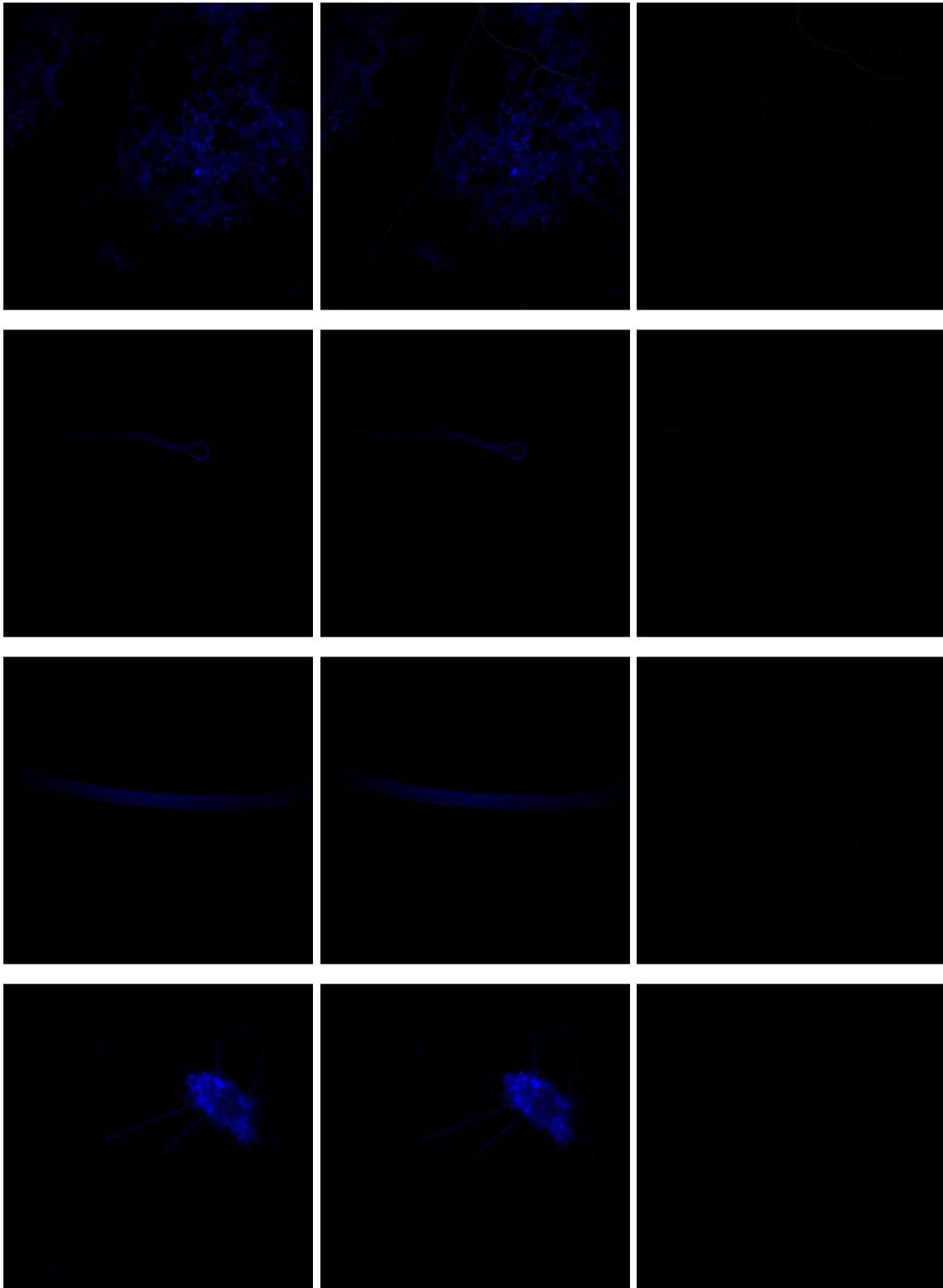


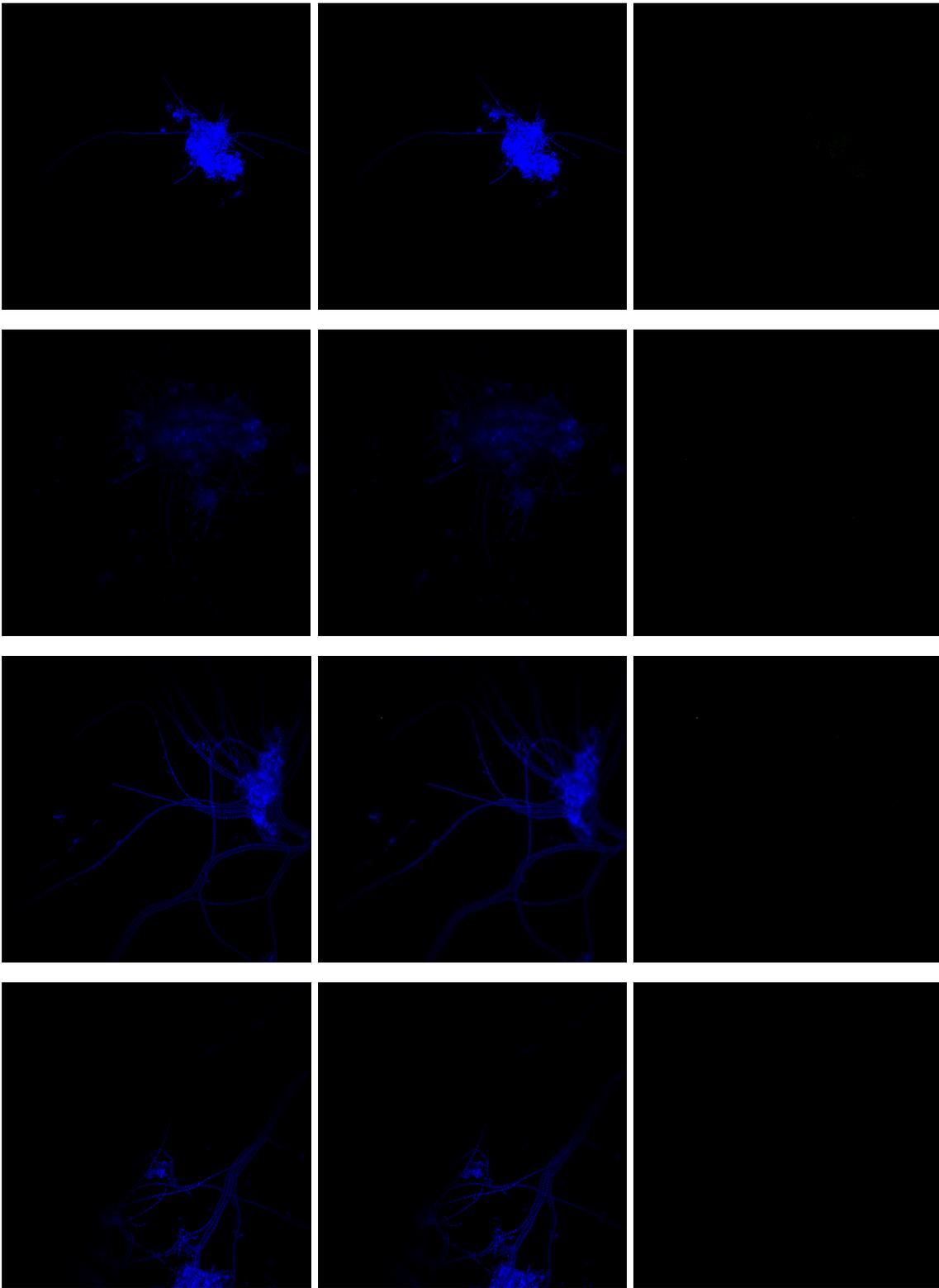
Muestras fijadas con Etanol



Fecha: 30-8-2016

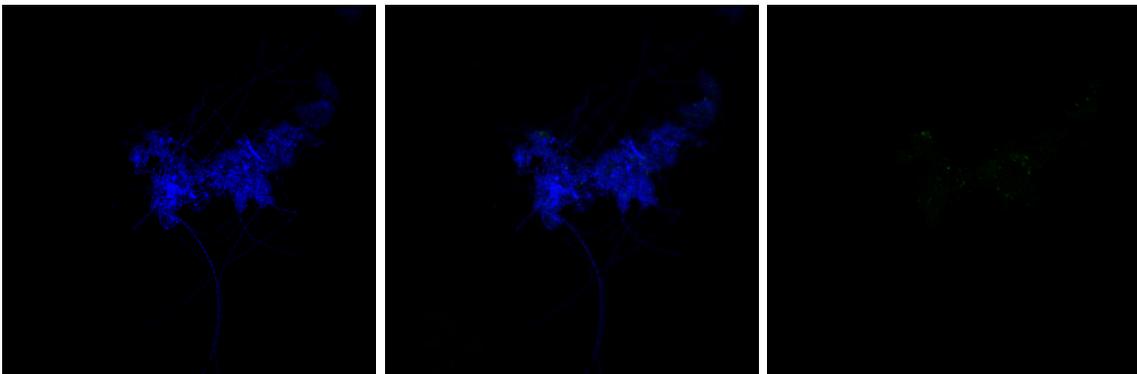
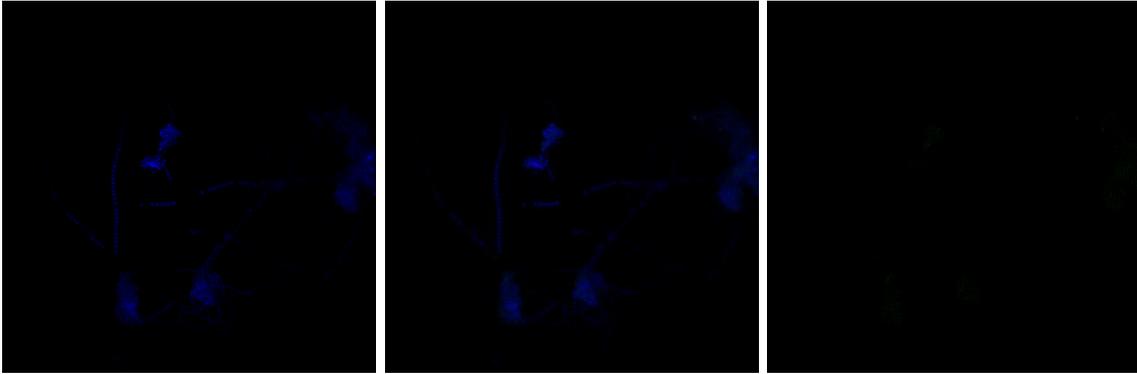
Muestras fijadas con PFA

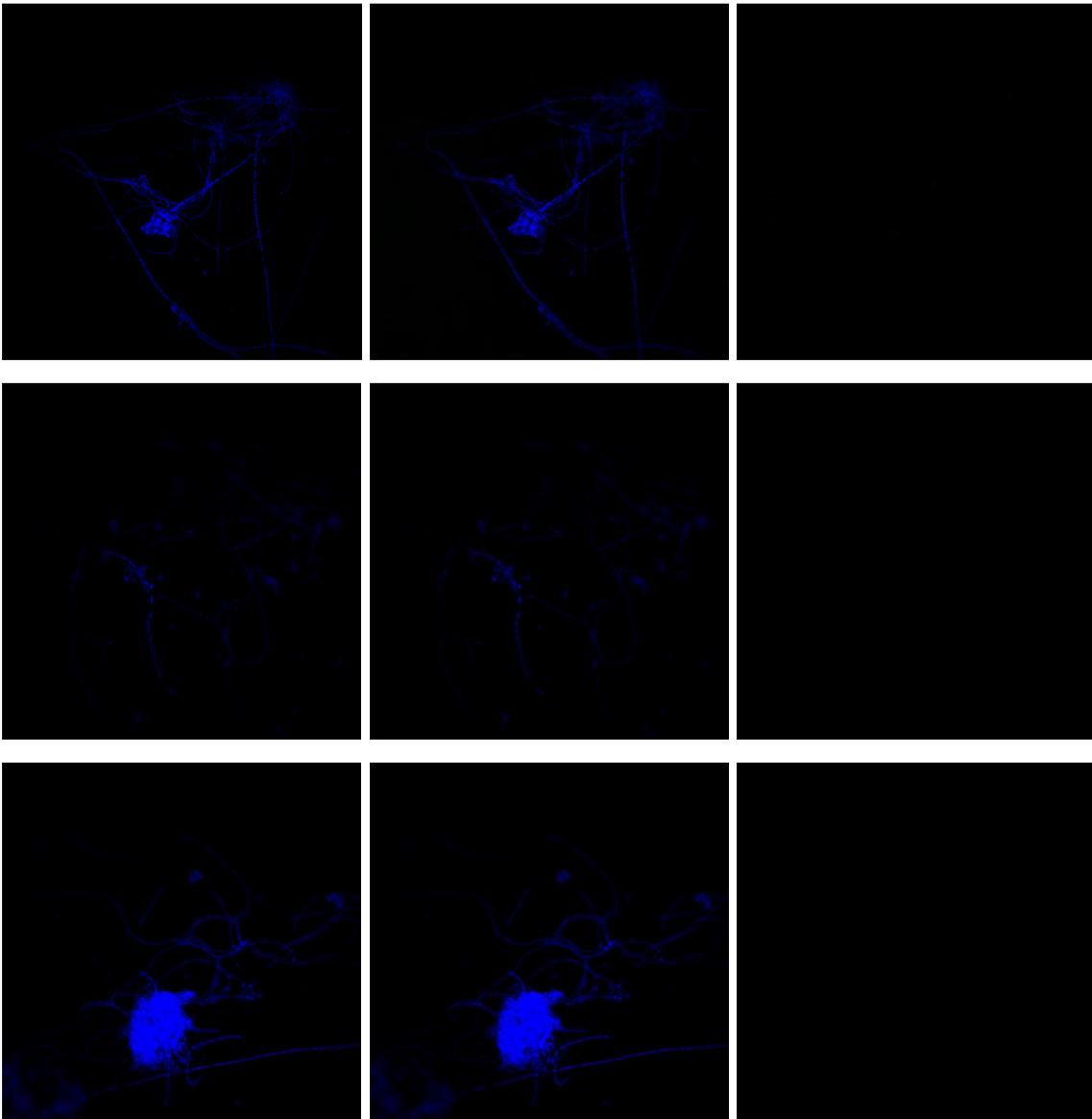




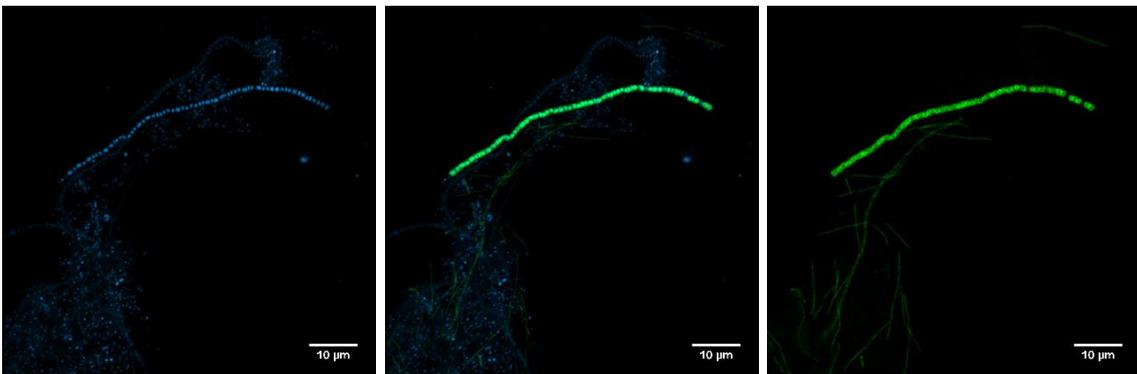


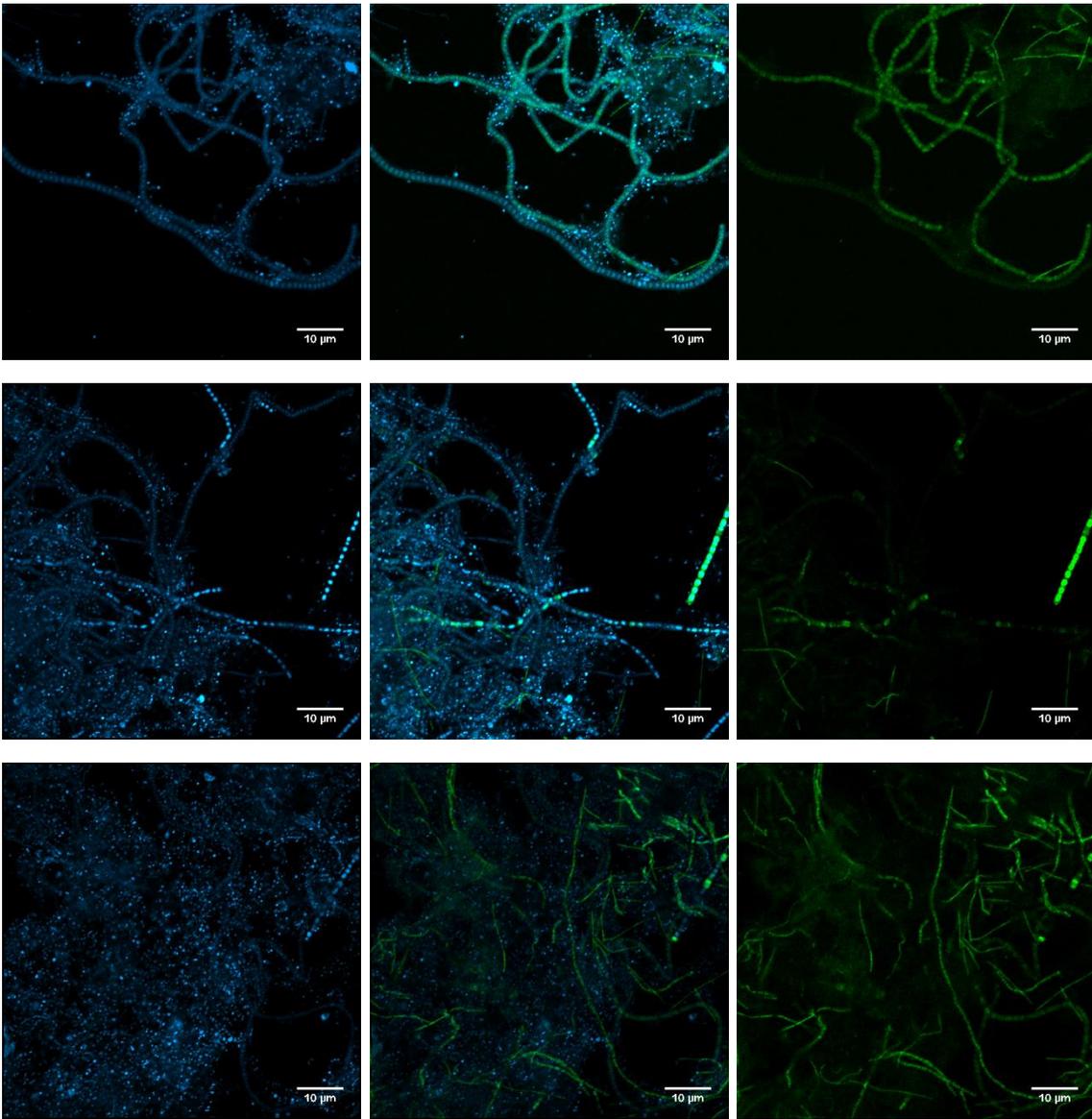
Fecha: 19-9-2017



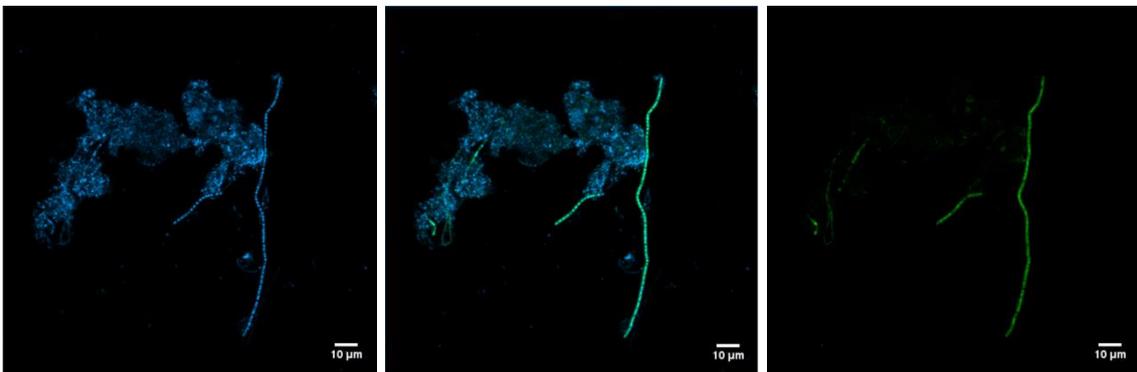


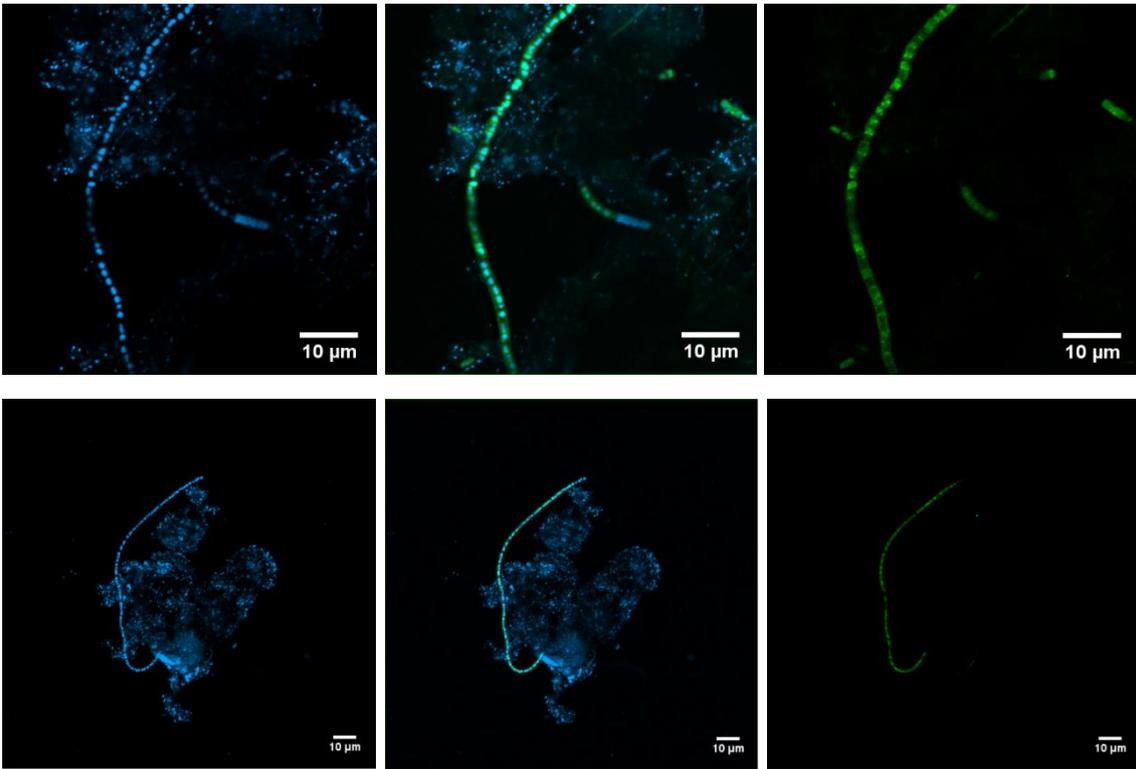
Fecha: 25-10-2016



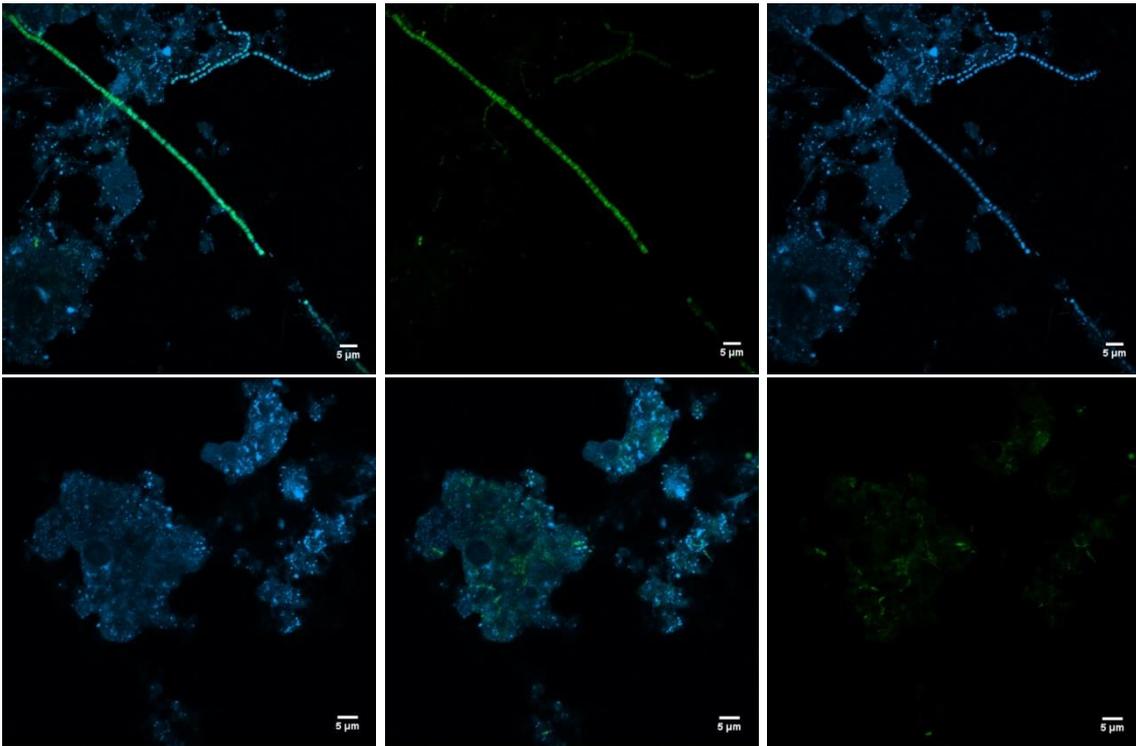


Fecha: 28-3-2017

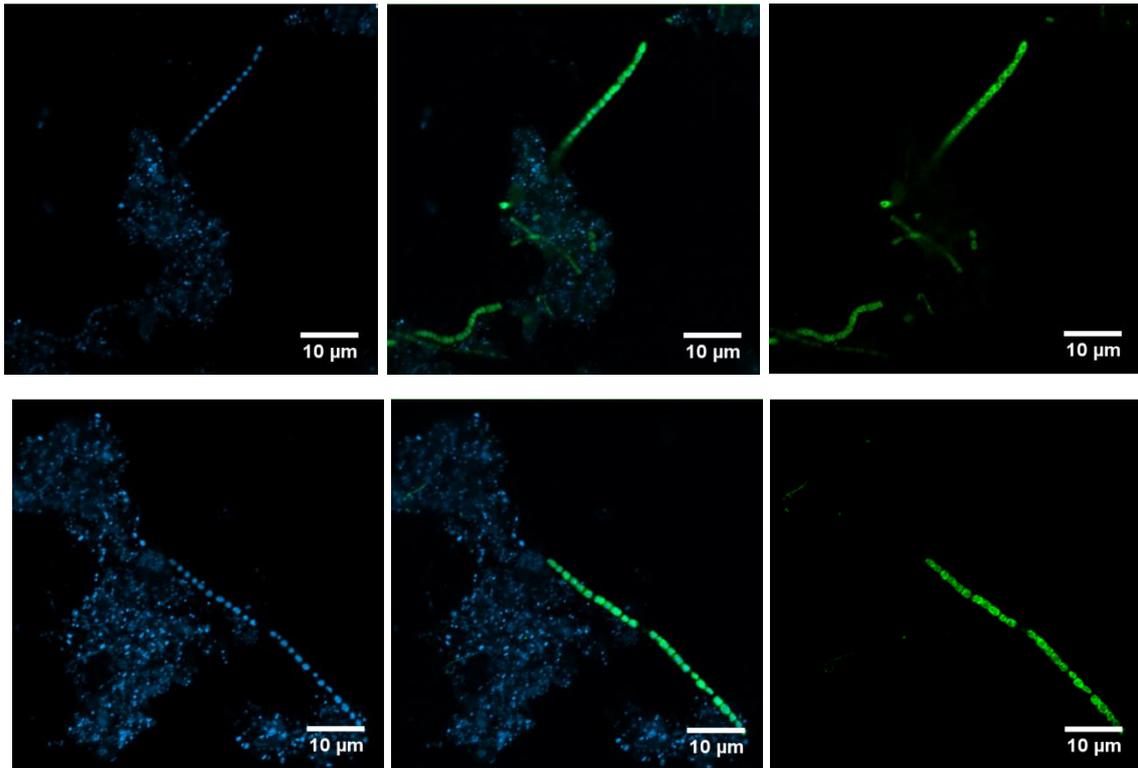




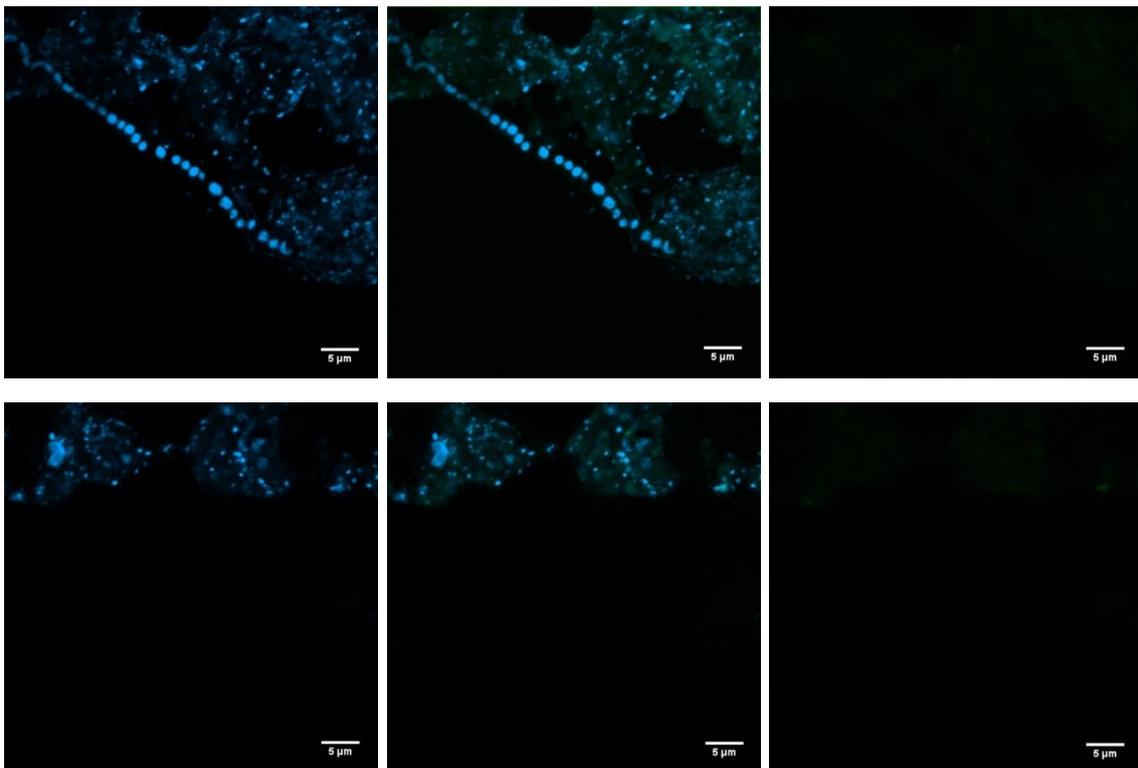
Fecha: 9-5-2017

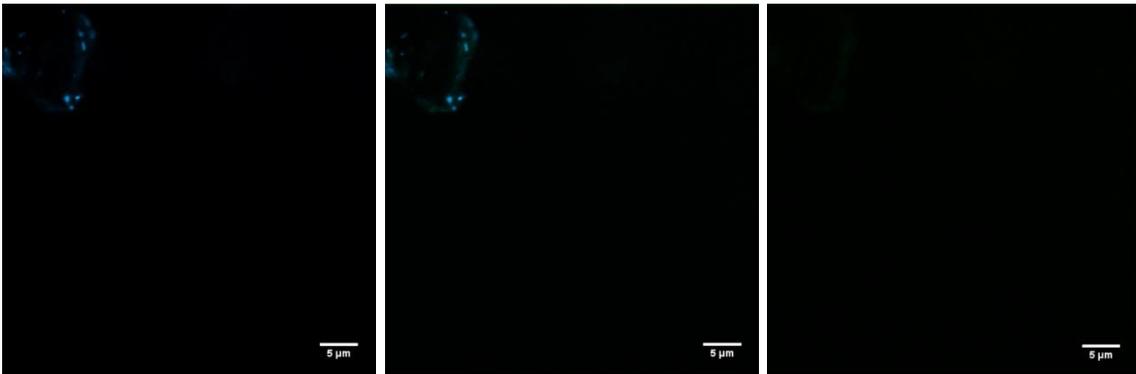


Fecha: 23-5-2017



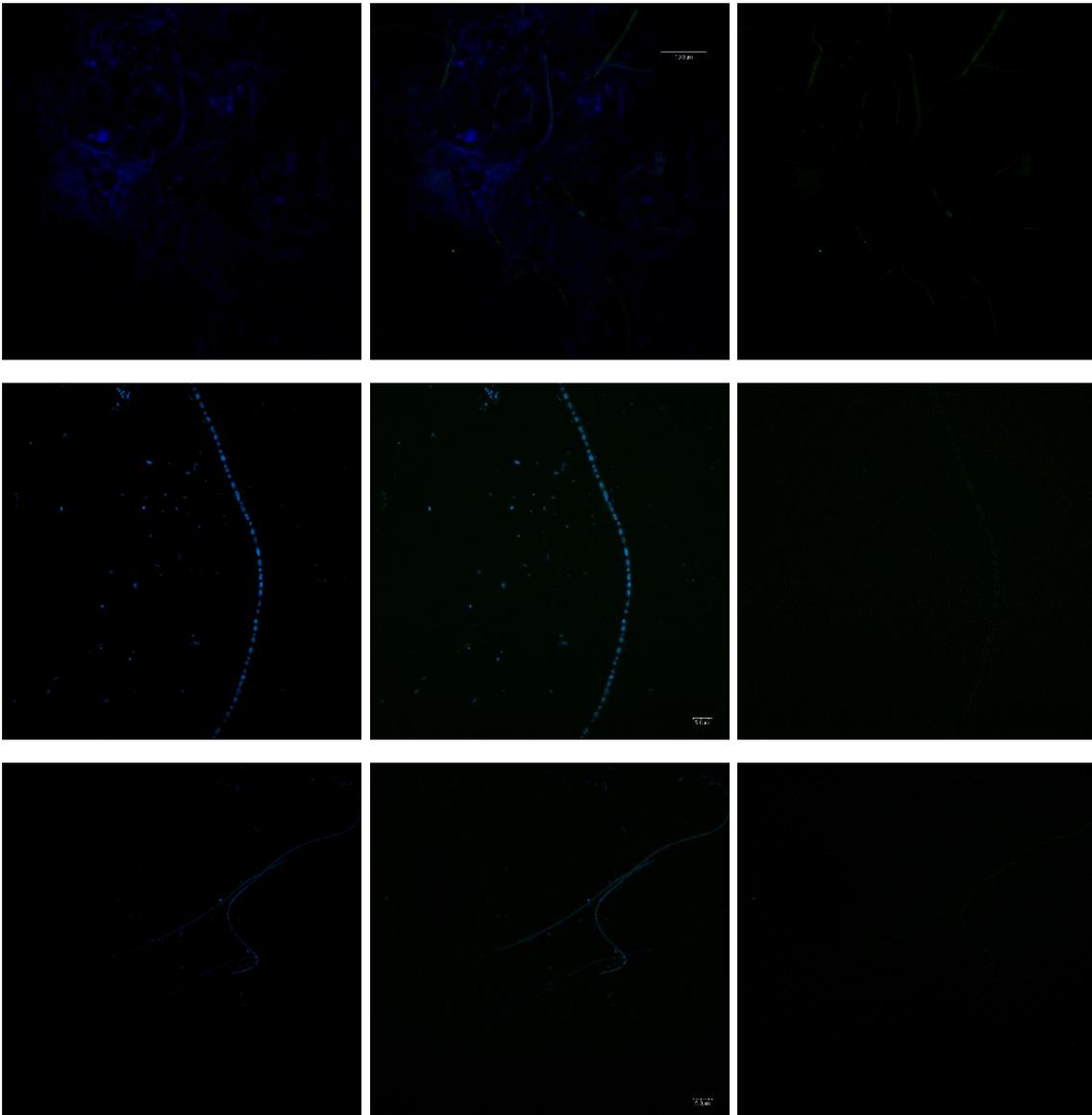
Fecha: 13-6-2017



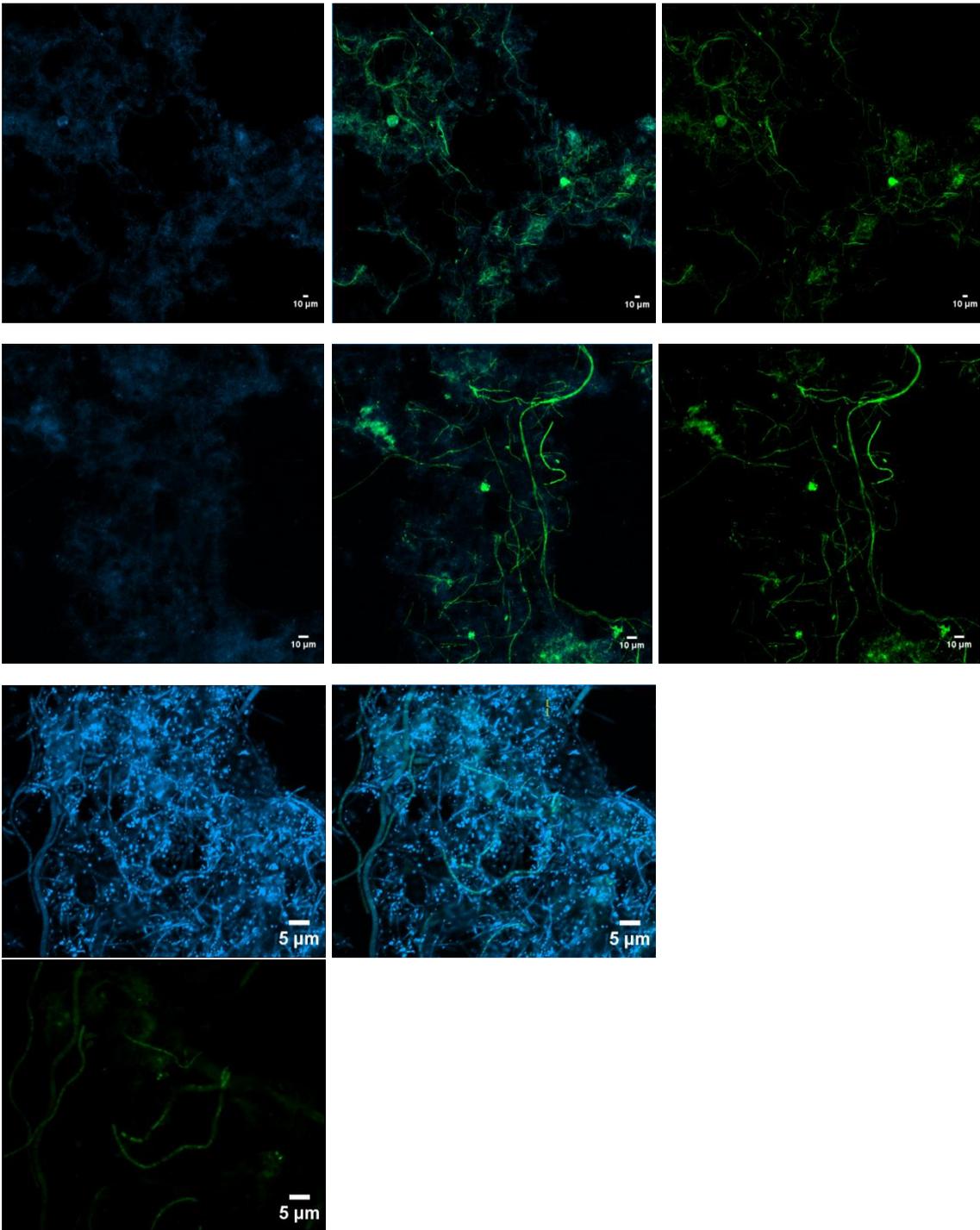


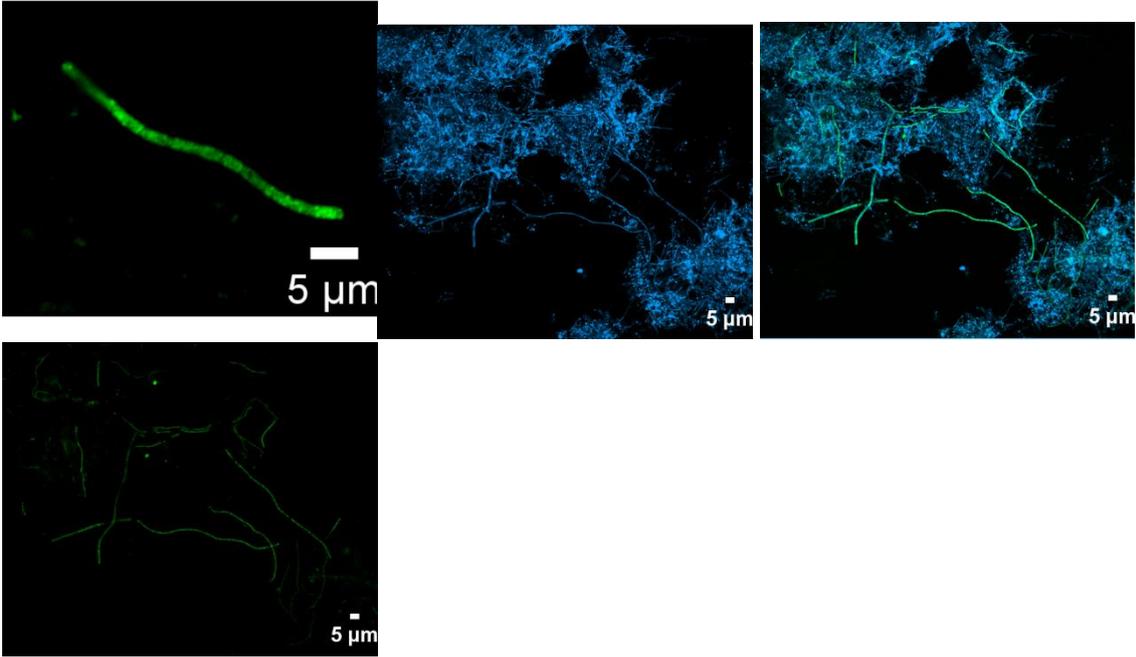
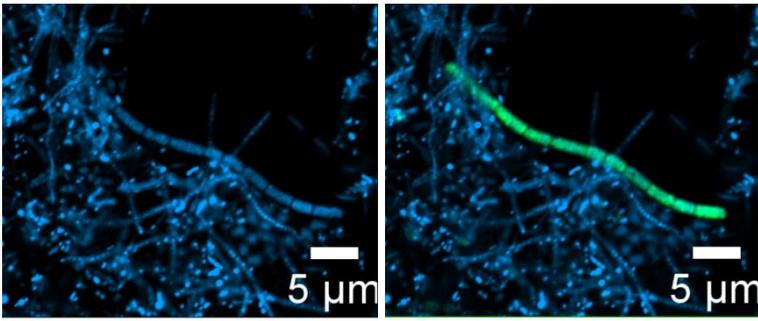
## BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS

Fecha: 10-8-2016

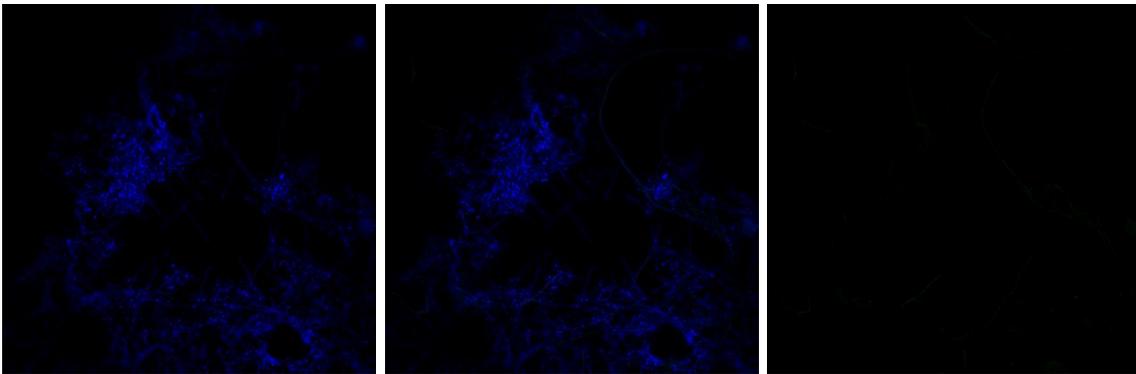


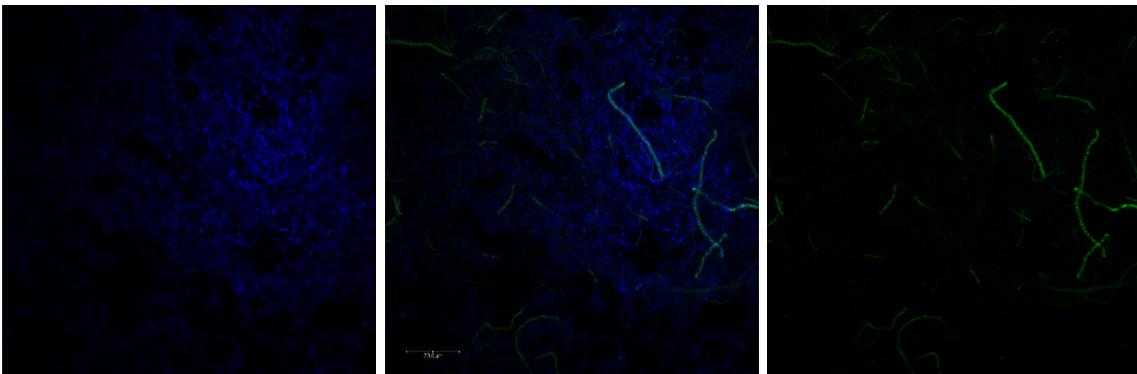
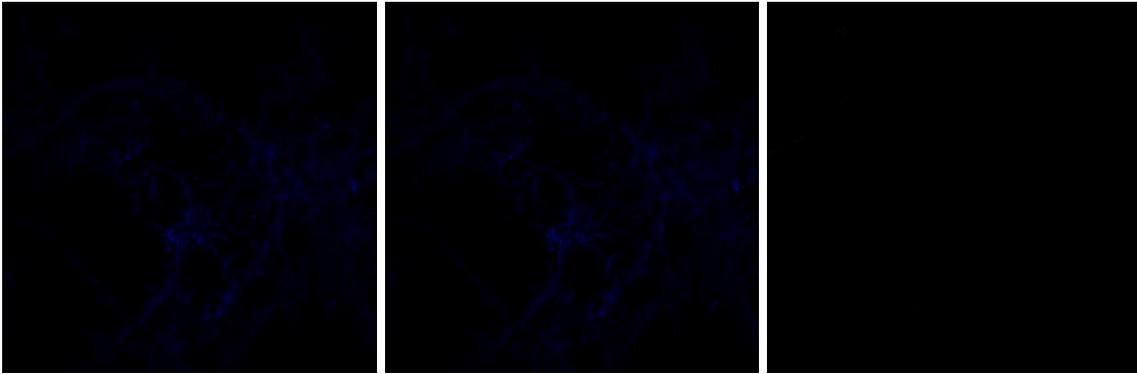
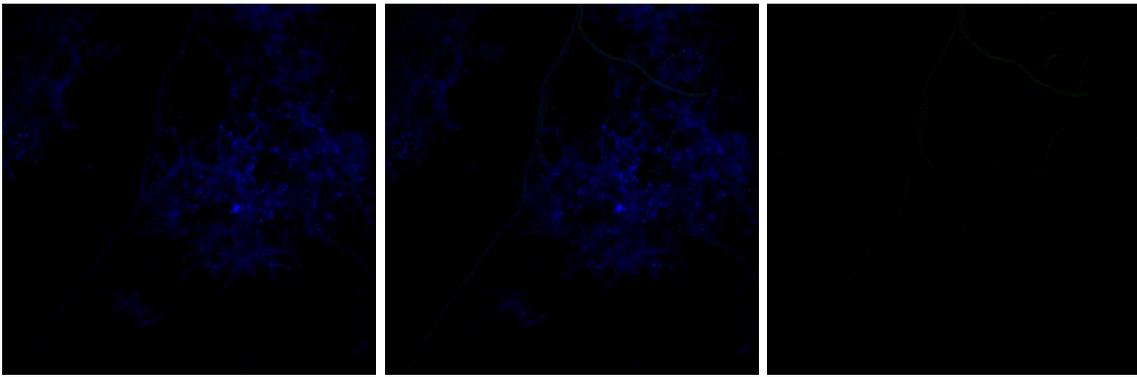
Fecha: 1-9-2016

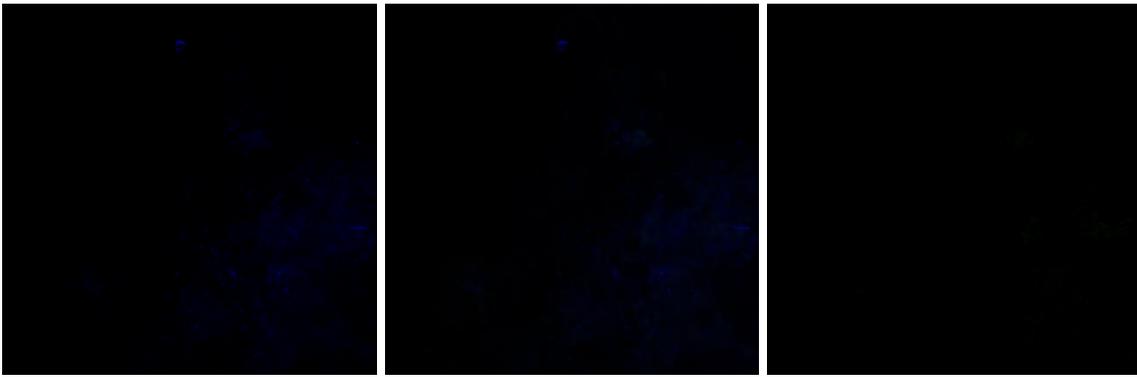




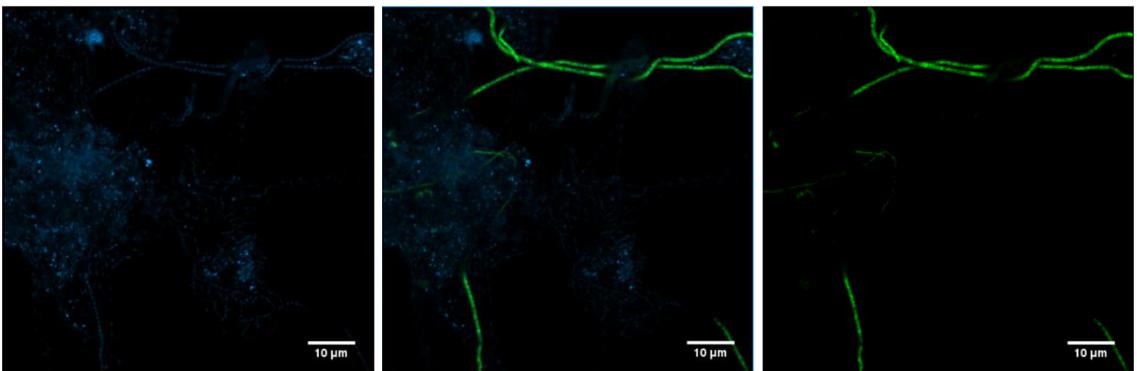
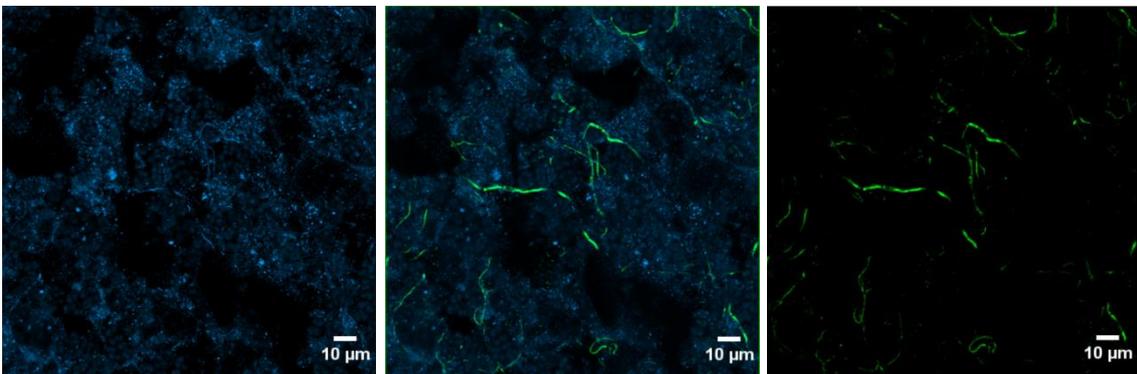
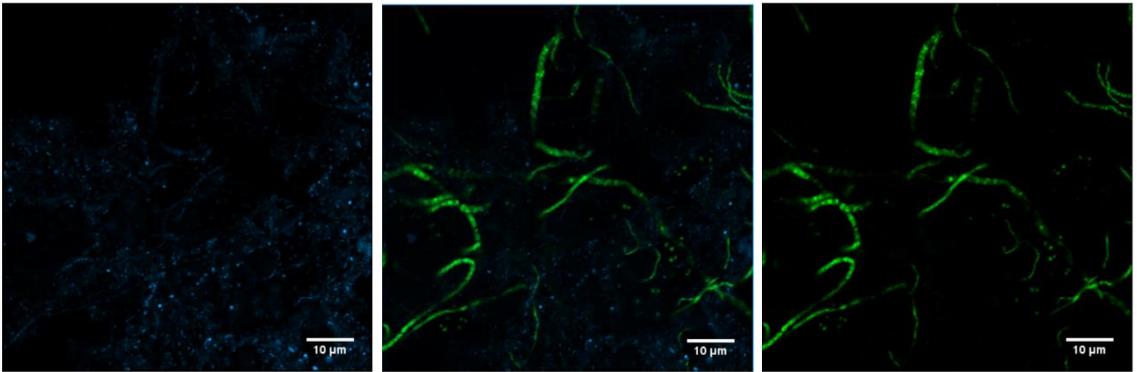
Fecha: 20-9-2016



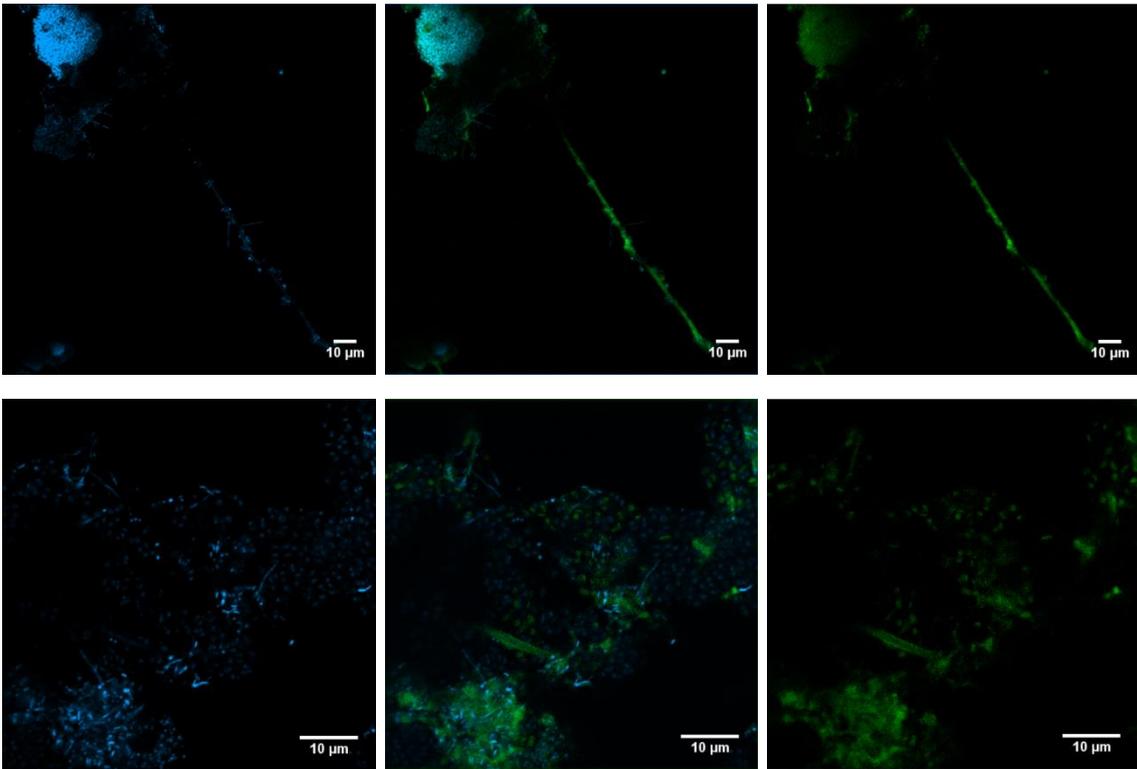




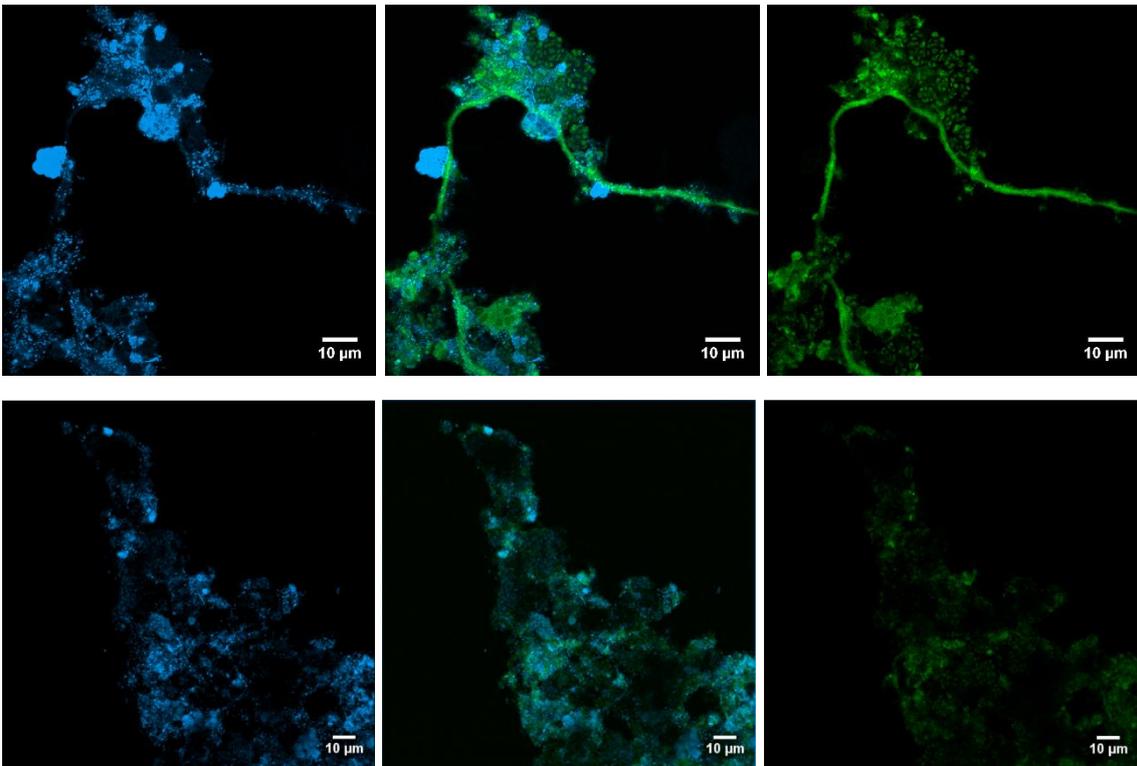
Fecha: 26-10-2016



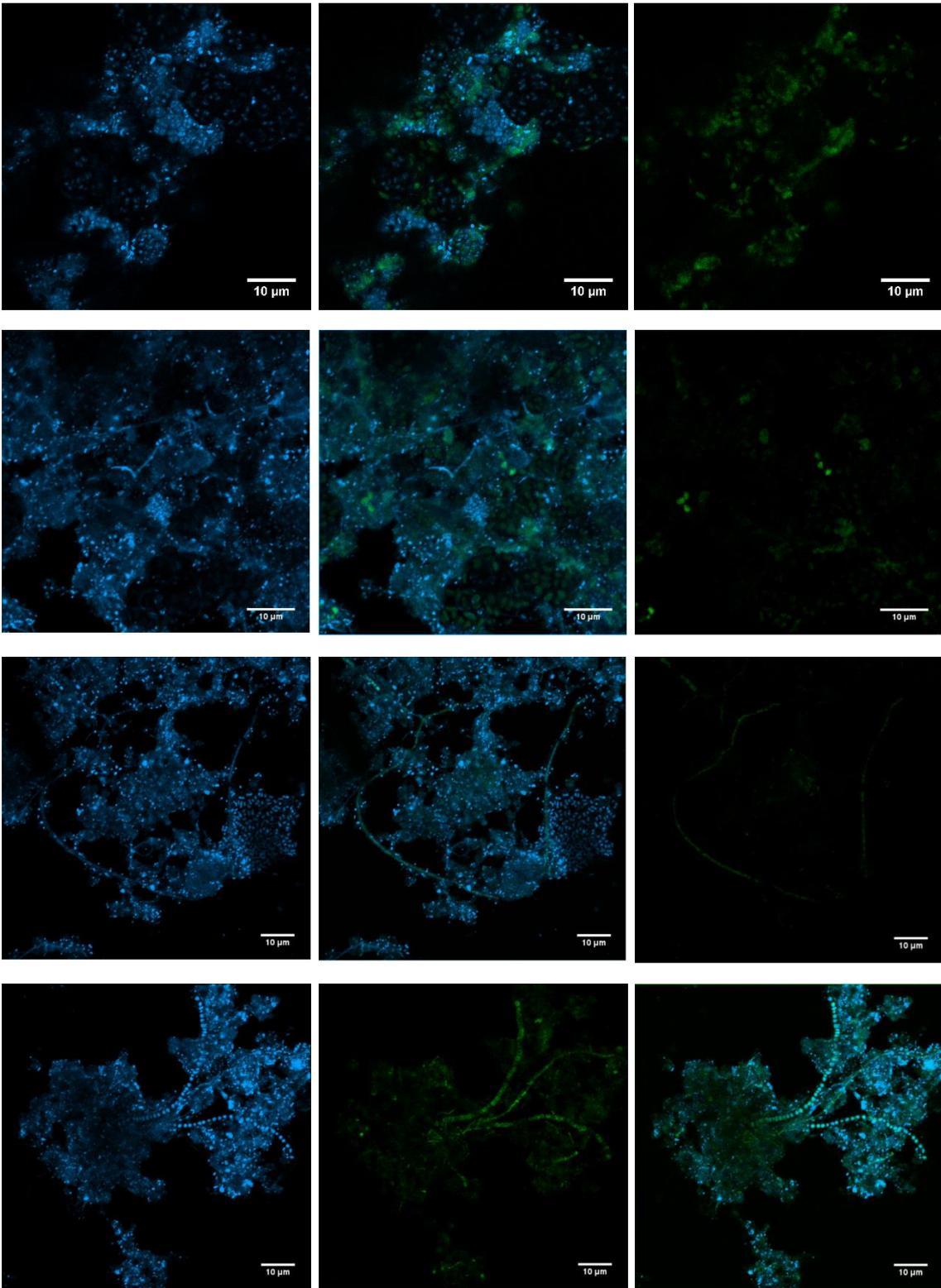
Fecha: 24-3-2017

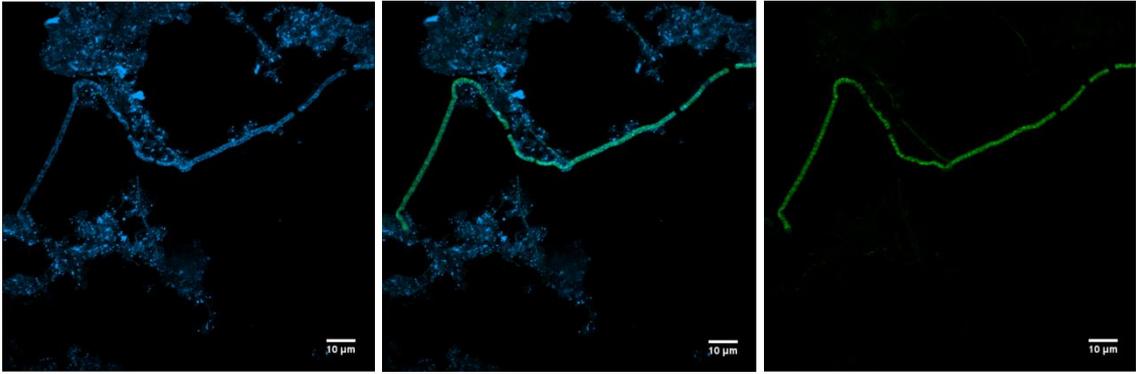


Fecha 26-4-2017

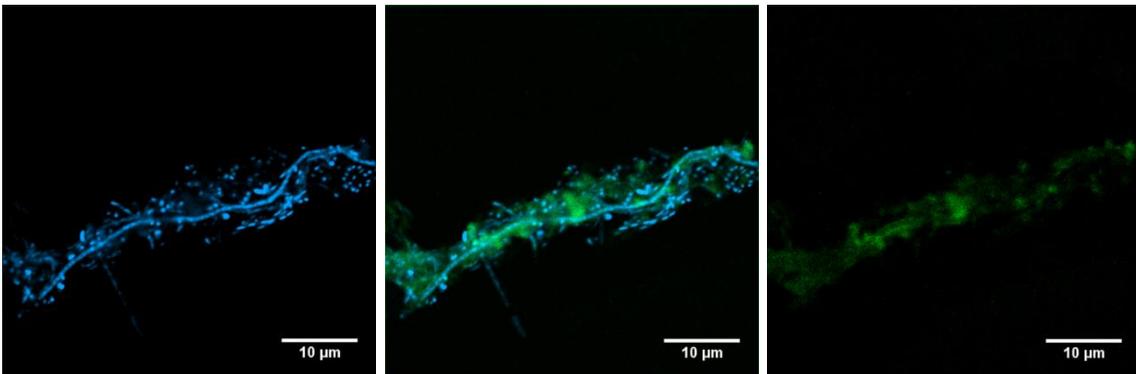


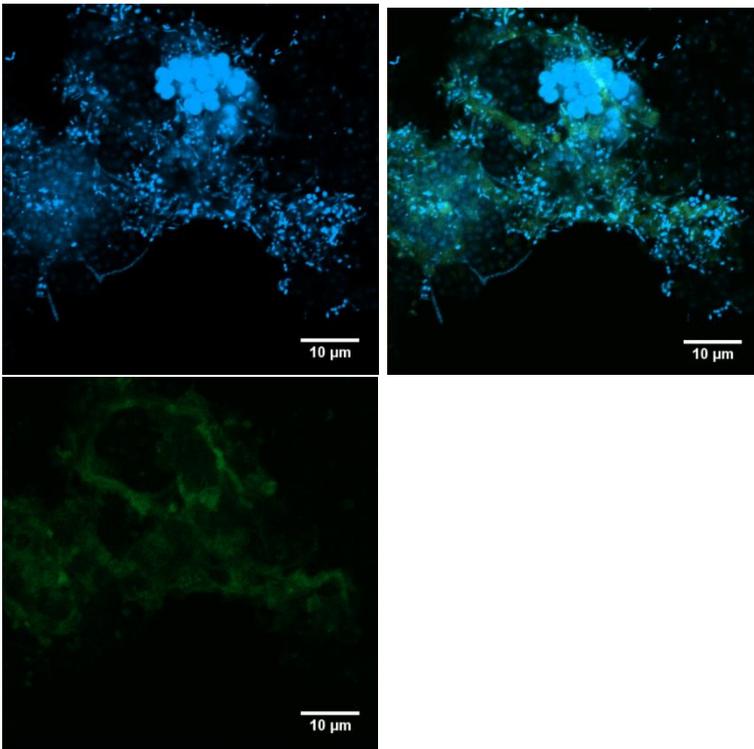
Fecha: 10-5-2017



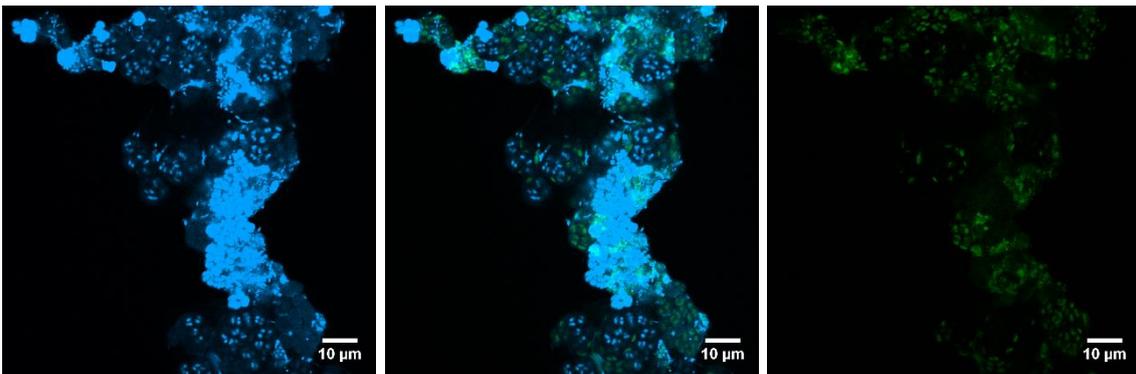


Fecha: 24-5-2017



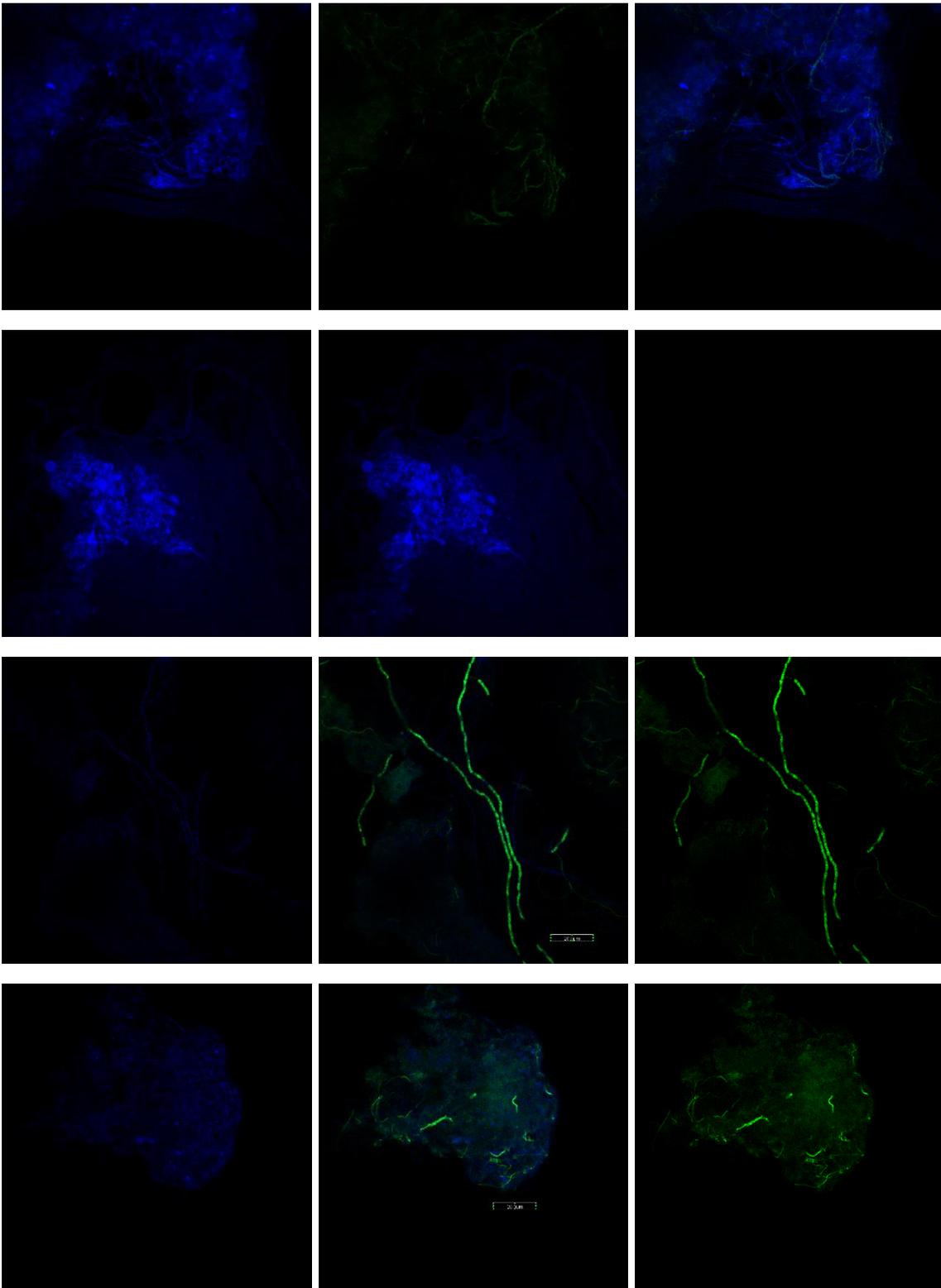


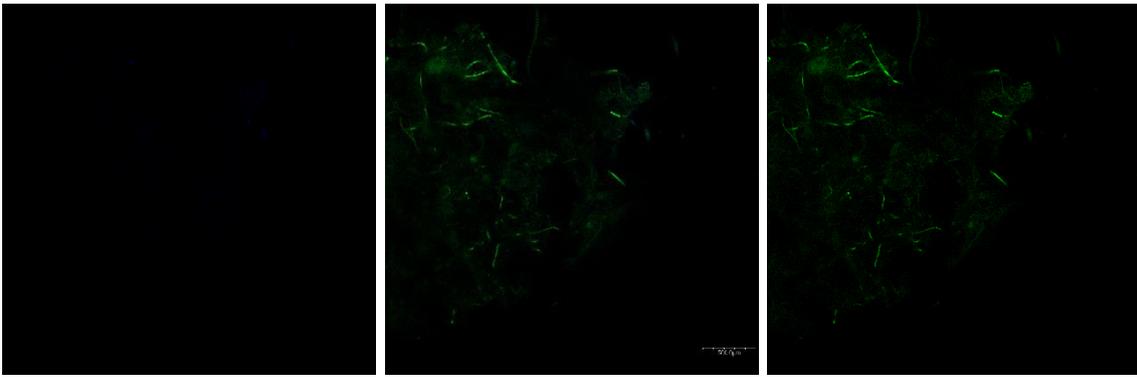
Fecha: 15-6-2017



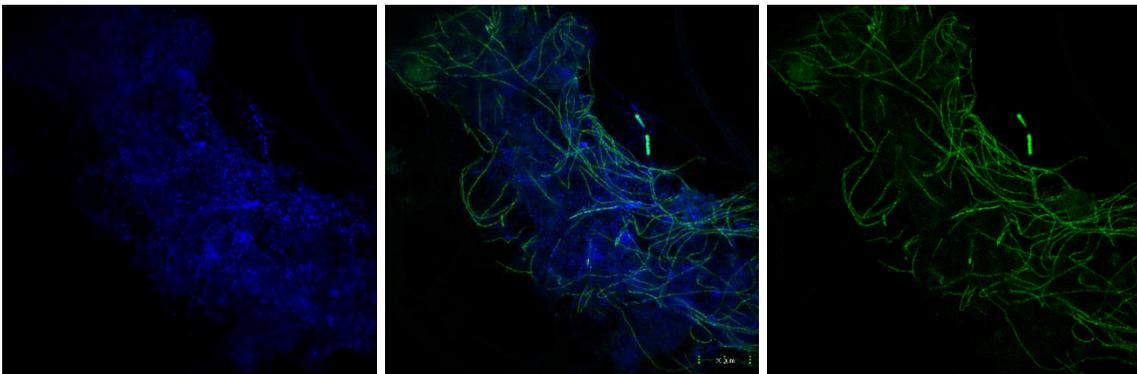
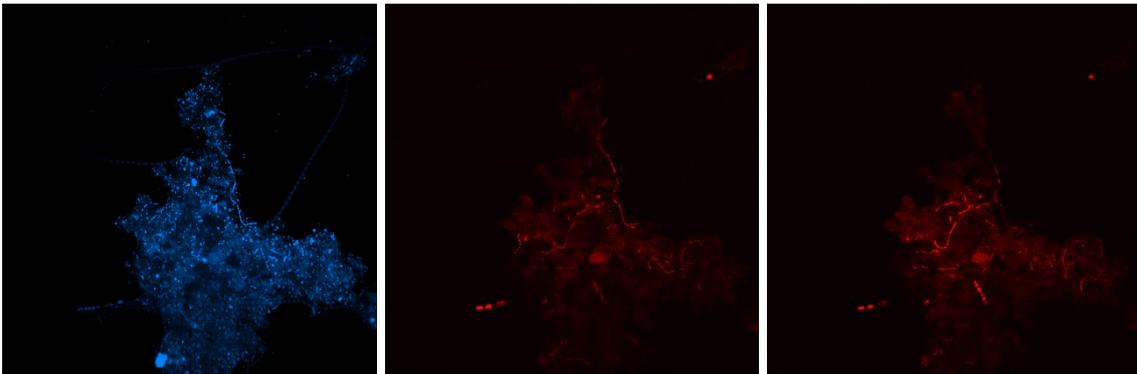
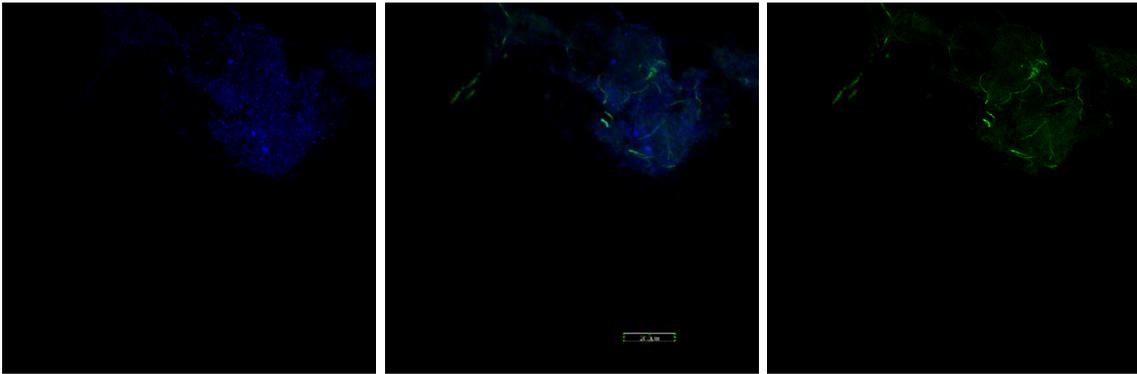
**RESIDUOS HOSPITALARIOS**

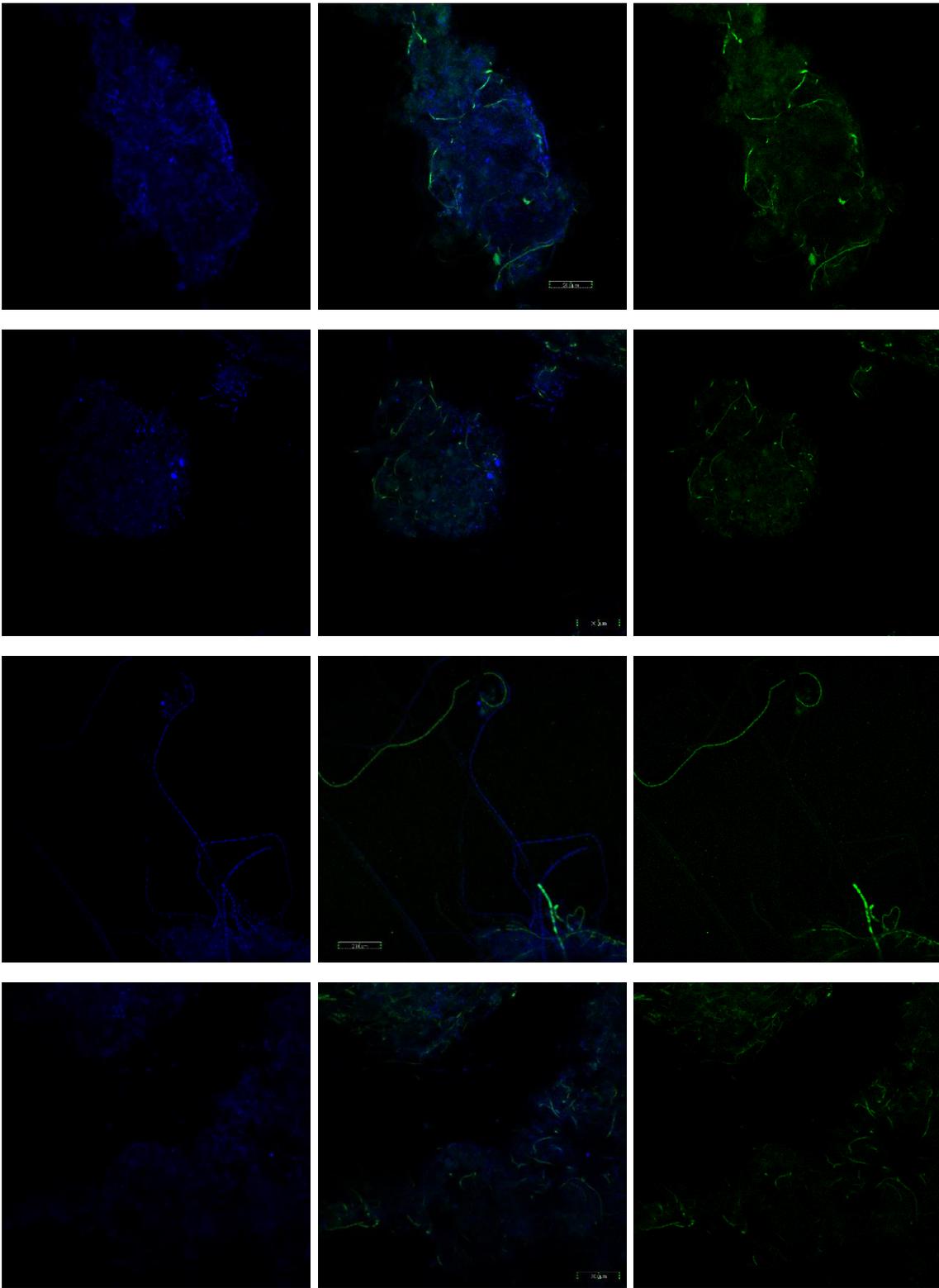
Fecha: 10-8-2016



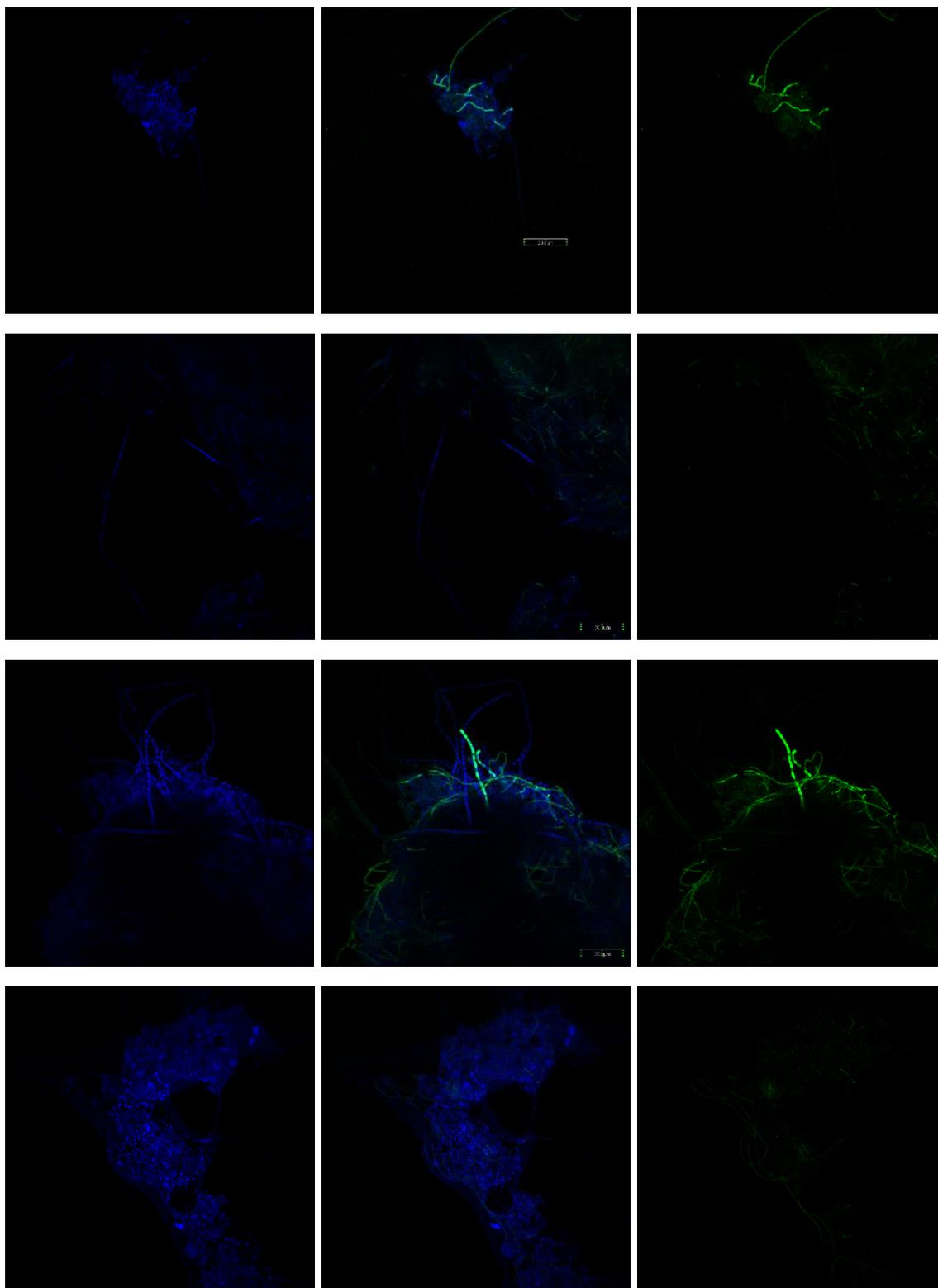


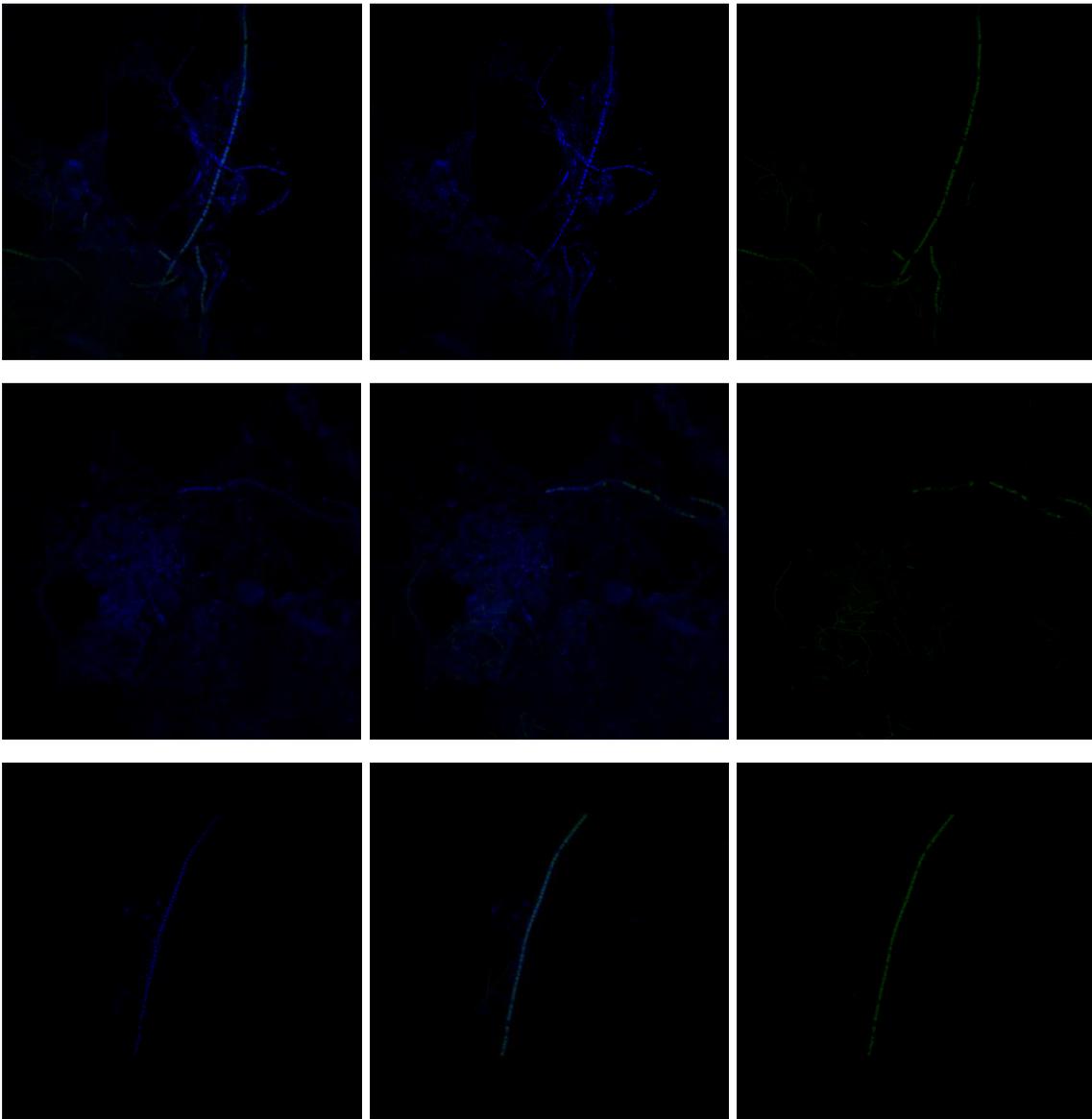
Fecha: 1-9-2016



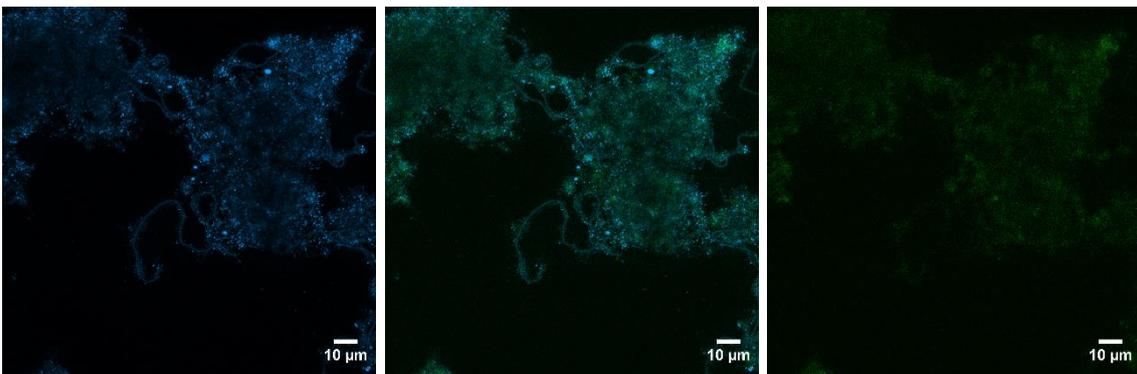


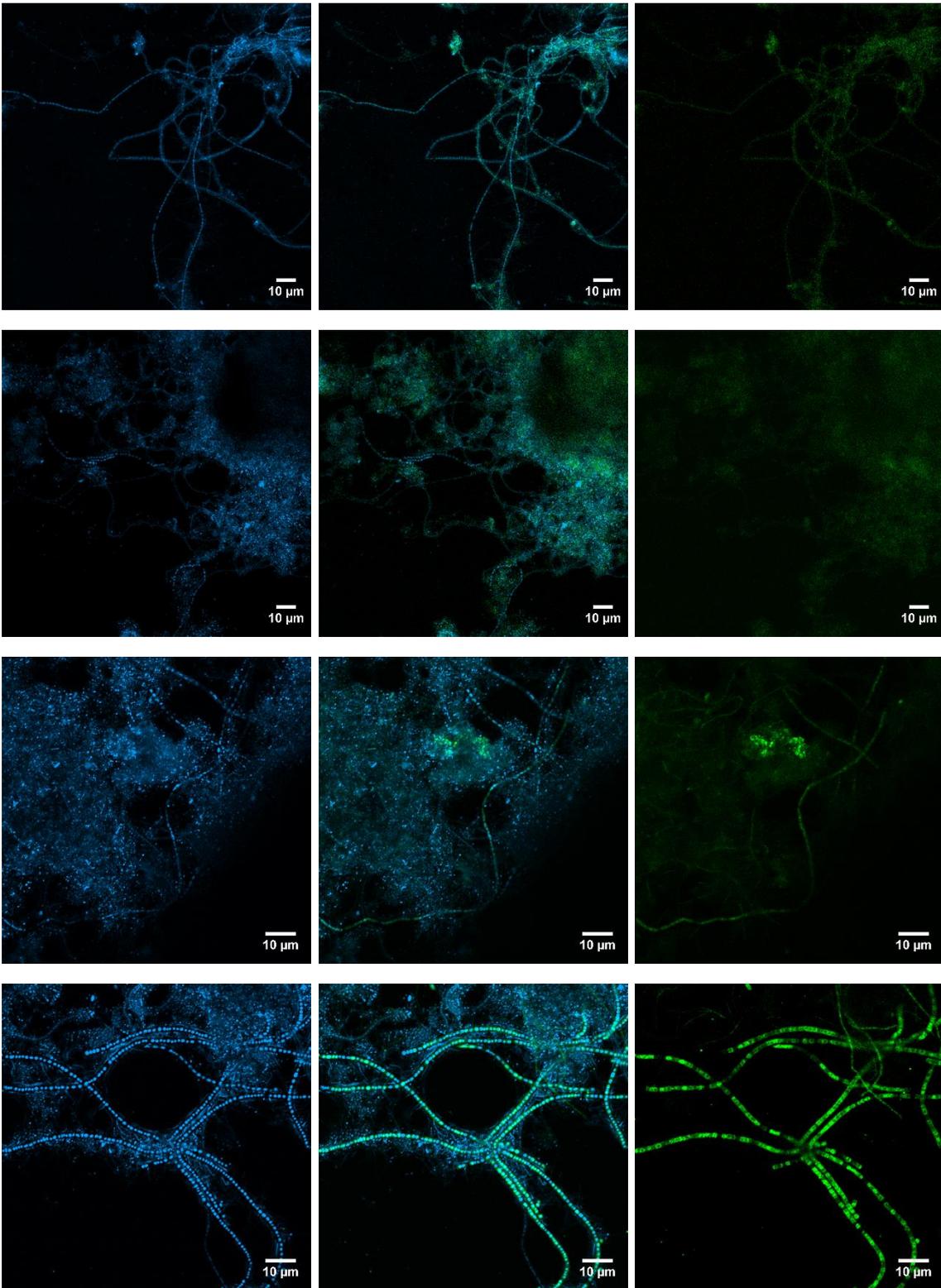
Fecha: 20-9-2016

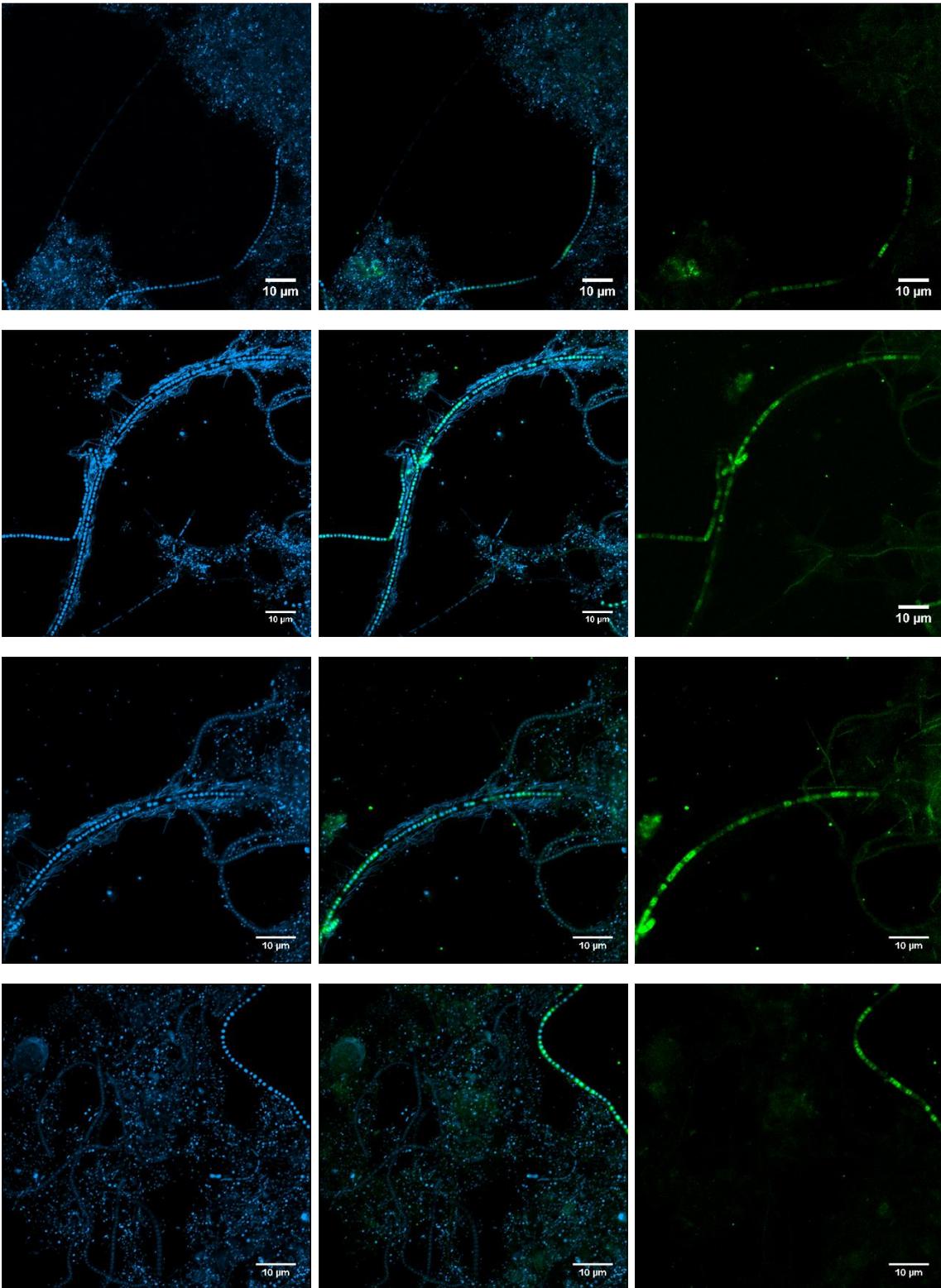




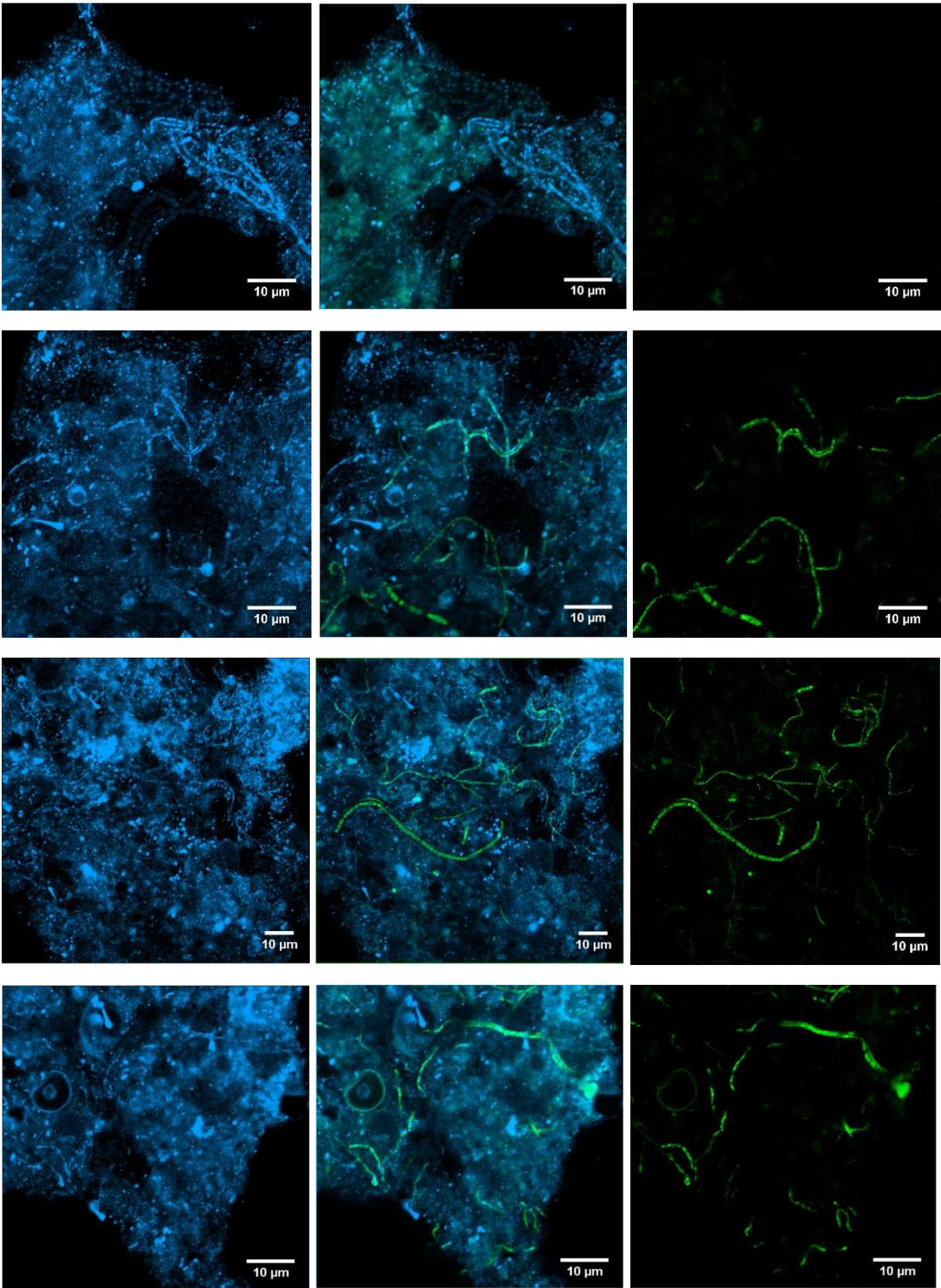
Fecha: 26-10-2016



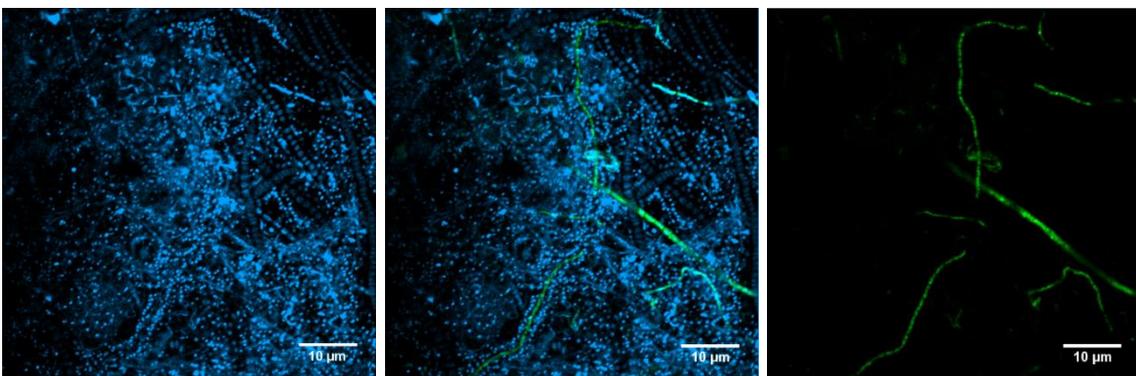
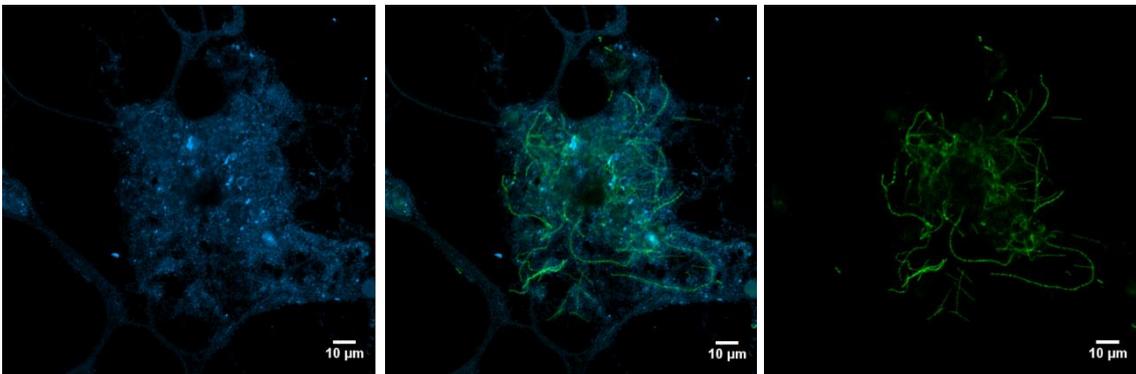
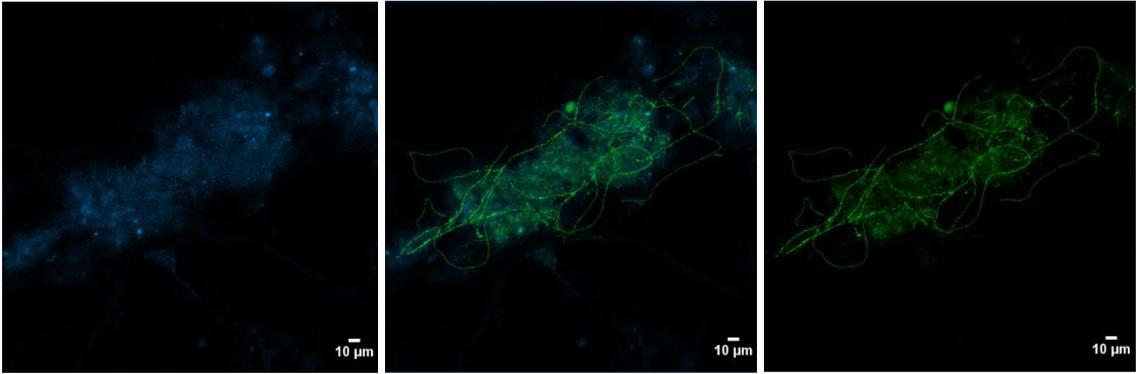
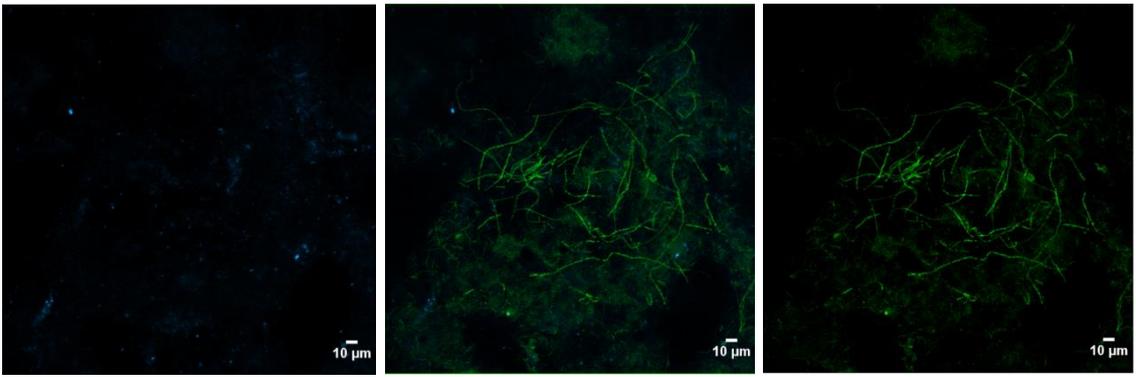


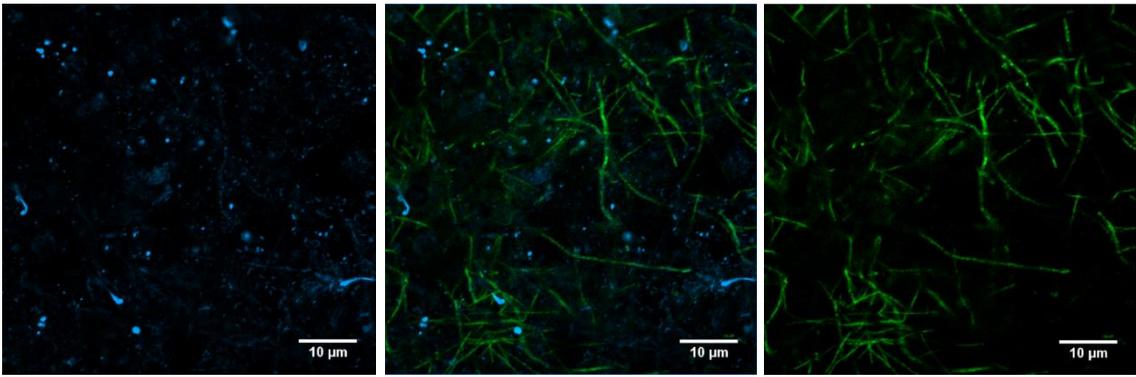


Fecha: 10-5-2017



Fecha: 24-5-2017





Fecha: 15-6-2017

