



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Ministerio
de Educación y Cultura



Maestría en Biotecnología

Estudio de la función de bacterias filamentosas del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Gerardo Gabriel Viera Silvera

Programa de Posgrado en Biotecnología
Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

ggabrielviera@gmail.com; gerardoviera2025@gmail.com / 097404913

Orientadora: Dra. Claudia Etchebehere
Co-Orientador: Dra. Patricia Bovio-Winkler
Financiación: Beca de maestría de la ANII
Montevideo– Uruguay
Junio de 2025

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA EN
BIOTECNOLOGÍA

Dra. Lucia Ferrando Magnabosco

Dra. Nadia Sofia Riera Faraone

Dra. María Verónica Saravia Silvera

Montevideo - Uruguay

2025

Agradecimientos

En primer lugar agradecer el camino recorrido, las personas, los eventos, a todo los compañeros y compañeras del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, al personal e investigadoras/investigadores.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por su apoyo financiero en el marco del proyecto FCE_1_2021_1_166934.

Al personal de la Plataforma Microscopía del IIBCE por su capacitación en microscopio confocal con sistema de EPIfluorescencia.

A las personas que me ayudaron en diferentes etapas.

A Msc. Inés Etchelet y la Dra. Natalia Rodríguez.

A la Dra. Angela Cabezas del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología (LabMAB) del Instituto Tecnológico Regional Centro Sur (ITRCS) de la UTEC y a la compañera Ing. Mariana Perroud, con quienes trabajamos conjuntamente, quienes monitorearon las diferentes plantas de tratamiento de agua residuales de lodos activados operadas en Uruguay,

A mi amigo Dr. Daniel Carnevia por su mentoría y ejemplo de resiliencia.

A la Lic. Micaela González compañera de las largas horas de laboratorio.

A mis amigos, amigas y amores que son una parte muy importante y linda de mi vida.

A mis grandes ídolos María Silvera y Miguel Viera por su crianza.

Y finalizando, a mi co-tutora la mejor del mundo, la Dra. Patricia Bovio-Winkler, gran compañera y mentora, quien me tuvo paciencia y me otorgó las herramientas para llevar a cabo este trabajo.

Por último, muy especialmente a la persona que me dio esta gran oportunidad, quien me abrió las puertas del IIBCE, me guío en este camino, a la Dra. Claudia Etchebehere, excelente investigadora y mejor persona, me otorgó todo su conocimiento, gran guía y referencia para mí.

Muy agradecido, un placer y un honor!!!

Resumen

En Uruguay, la intensificación agroindustrial y los desafíos en la gestión de las aguas hacen necesario optimizar los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En particular, los sistemas de lodos activados son de los más utilizados en el país y en el mundo pero se conoce poco de la microbiología de estos sistemas que operan en nuestro país. Si bien son sistemas muy robustos en algunas ocasiones presentan problemas de operación, conocer la microbiología de estos sistemas permite buscar soluciones a estos problemas y evitar pérdidas económicas y problemas ambientales.

Los organismos del filo Chloroflexota se encuentran frecuentemente en los sistemas de tratamiento de aguas residuales biológicas tanto aerobios como anaerobios, pero aún se conoce poco sobre el rol que cumplen en estos sistemas. Se postula que tienen un rol fundamental en dos aspectos: degradan la materia orgánica compleja debido a su capacidad hidrolítica y son fundamentales en la formación y mantenimiento de los flóculos debido a su morfología filamentosa. Por otro lado, se ha postulado que también son responsables de problemas de mala sedimentación de los lodos, pero no se conoce las causas que lo provocan.

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto FCE_1_2021_1_166934 realizado en colaboración entre el Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) del IIBCE y el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología (LabMAB) del Instituto Tecnológico Regional Centro Sur (ITRCS) de la UTEC con el objetivo de caracterizar la diversidad, abundancia y función del filo Chloroflexota en plantas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados en Uruguay.

En este trabajo se aplicaron técnicas de biología molecular como qPCR, secuenciación masiva del gen ARNr de 16S y técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), para analizar muestras recolectadas de 11 plantas de tratamiento de aguas residuales de cinco tipos de industrias: celulosa, frigorífica, maltería, mermeladas, vitivinícola y de tratamiento de efluentes domésticos.

Para determinar si la abundancia de los microorganismos del filo Chloroflexota se correlaciona con los problemas de sedimentación, se seleccionaron plantas de tratamiento de aguas residuales con y sin reportes de problemas de sedimentabilidad. Para evaluar si hay una selección de

diferentes grupos de microorganismos dependiendo del tipo de industria de donde provienen las muestras.

Los resultados de qPCR revelaron que estos microorganismos son abundantes en todas las plantas de tratamiento analizadas, con concentraciones que oscilan entre $2,02E+02$ y $7,00E+04$ copias/ng de ADN total. Los niveles más bajos se detectaron en una muestra proveniente de una planta de la industria frigorífica, mientras que los valores más altos correspondieron a una planta de tratamiento de efluentes de la industria de celulosa. Estos valores son comparables a los reportados en la literatura para sistemas de lodos activados, aunque muy inferiores a los detectados en reactores metanogénicos de gránulos.

El análisis de comunidades mediante secuenciación del gen del ARNr 16S mostró la presencia del filo Chloroflexota en todas las plantas, con una abundancia relativa que varió entre 1,8 % y 39,7 %, predominando la clase Anaerolineae. A nivel de género, se identificaron géneros específicos dependiendo de la planta y del tipo de agua residual tratada; la mayoría de estos géneros no cuentan con representantes cultivados, aunque han sido detectados en sistemas de tratamiento de aguas residuales, lo que evidencia un considerable desconocimiento sobre estos microorganismos.

El análisis multivariado mediante PCoA mostró un agrupamiento de las muestras según la planta de tratamiento y el tipo de efluente tratado, tanto para la comunidad microbiana total como para los microorganismos del filo Chloroflexota, indicando una fuerte selección en función del origen del efluente. Sin embargo, no se encontró una relación entre la abundancia del filo Chloroflexota y la baja calidad de sedimentación de los lodos, lo que sugiere que estos microorganismos no son responsables directos de los problemas de sedimentación observados. Además, mediante técnicas de FISH, se pudo visualizar la morfología filamentosa de estos microorganismos en varias muestras, lo que indica un papel potencialmente importante en la formación de flóculos biológicos.

En conclusión, este estudio aporta información valiosa sobre la presencia y diversidad de los microorganismos del filo Chloroflexota en las plantas de tratamiento de aguas residuales del país, destacando su potencial papel en estos sistemas y resaltando la necesidad de futuras

investigaciones para comprender mejor su función y impacto en la sedimentación y eficiencia de los procesos.

Palabras clave: Chloroflexota, Anaerolineae, tratamiento de aguas residuales, bulking filamentoso, lodos activados, FISH, qPCR, Uruguay.

Índice

Introducción.....	9
Contexto nacional y marco normativo sobre calidad del agua en Uruguay.....	9
Límites de vertido según el uso del agua en Uruguay.....	11
Tratamiento biológico aguas residuales: sistemas aerobios y anaerobios.....	14
Sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados.....	16
Principales componentes del sistema.....	16
Ventajas y desafíos.....	18
Microbiología del sistema de lodos activados y floculación.....	18
Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados.....	18
Bulking filamentoso: causas y control.....	21
¿Qué es el bulking y cómo se detecta?.....	21
Microorganismos causantes de bulking según MiDAS y estudios vinculados.....	22
Microorganismos del filo Chloroflexota.....	23
Del nombre Chloroflexi a Chloroflexota.....	23
Clases incluídas dentro del filo Chloroflexota.....	24
Géneros de relevancia en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	25
Detección de microorganismos del filo Chloroflexota por técnica de FISH y qPCR en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	26
Avances metagenómicos y caracterización funcional.....	27
Antecedentes.....	29
Métodos de biología molecular para el estudio de microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	30
Antecedentes del tema en el grupo de investigación.....	31
Hipótesis de trabajo.....	36
Objetivos.....	38
Preguntas a responder.....	38
Objetivos Específicos.....	38
Metodología / Estrategia de trabajo.....	39
Estrategia de trabajo.....	39
Materiales y Métodos.....	40
Características del agua residual tratada en las diferentes plantas.....	42
Industria de faena de animales vacunos.....	43
Industria de producción de malta para cerveza.....	44
Industria de producción de mermeladas y dulces.....	45
Industria vitivinícola.....	45
Plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas.....	47
Industria de producción de celulosa.....	48
Procesamiento de las muestras.....	50
Extracción de ADN.....	51

Cuantificación del número de copias de organismos del filo Chloroflexota mediante qPCR	51
Técnica de hibridación in situ fluorescente.....	52
Análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S.....	53
Resultados y discusión.....	53
Cuantificación del filo Chloroflexota por qPCR.....	53
Análisis por industria.....	55
Efecto del tipo de agua residual sobre la abundancia de organismos del filo Chloroflexota.	56
Análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S.....	58
Comunidad microbiana total.....	58
Comunidad microbiana dentro del filo Chloroflexota.....	64
Observación de la morfología de las bacterias del filo Chloroflexota mediante FISH.....	74
Discusión.....	78
¿Cuál es la abundancia de bacterias del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de nuestro país?.....	81
¿Su abundancia depende del tipo de agua residual tratada?.....	82
¿Cuál es la diversidad del filo Chloroflexota en las plantas de tratamientos de aguas residuales que están operando en el país?.....	82
¿Difieren según el tipo de agua residual que tratan los sistemas?.....	88
¿Tienen morfología filamentosa?.....	89
¿Existe una relación entre la abundancia de estos microorganismos y la sedimentabilidad del lodo?.....	90
Implicancias ecológicas y funcionales.....	92
Conclusiones y perspectivas.....	92
Bibliografía.....	94
ANEXO.....	103

Introducción

Contexto nacional y marco normativo sobre calidad del agua en Uruguay

Uruguay se encuentra inmerso en un contexto agro productivo intensivo, donde más del 90 % de la superficie del territorio es apta para la actividad agropecuaria (Bonilla et al., 2015; Mesa Técnica del Agua, 2017). Este modelo genera presiones significativas sobre los cuerpos de agua dulce, principalmente en forma de contaminación difusa de origen agropecuario e industrial. Uno de los efectos más notorios de esta presión es el proceso de eutrofización, vinculado al incremento de nutrientes como nitrógeno y fósforo, que derivan en un deterioro de la calidad del agua y en la proliferación de floraciones algales, incluyendo especies de cianobacterias potencialmente tóxicas (Chorus & Bartram, 1999).

En este escenario, el marco regulatorio nacional vigente en materia de calidad del agua está definido por el Decreto 253/979, el cual establece clases de calidad hídrica en función del uso previsto de los cuerpos de agua. La Clase 3, que es la más ampliamente asignada por defecto a cursos con cuencas mayores a 10 km², está orientada a la preservación de la flora y fauna acuáticas, el riego de cultivos, y el mantenimiento de condiciones compatibles con la vida acuática (Mesa Técnica del Agua, 2017).

Límites de vertido según el uso del agua en Uruguay

Según el Decreto N° 253/979, Uruguay clasifica los cuerpos de agua en cuatro clases según su uso predominante, y establece límites específicos de calidad para cada una (tabla 1):

Clasificación de cuerpos de agua y límites de vertido

- Clase 1 – Abastecimiento de agua potable. Agua destinada o potencialmente destinada al consumo humano con tratamiento convencional.
- Clase 2a – Riego de cultivos de consumo directo y recreación con contacto humano.
- Clase 2b – Recreación sin contacto directo o riego sin mojado del producto.
- Clase 3 – Preservación de fauna/flora acuática o riego de cultivos no consumidos en forma natural.
- Clase 4 – Cursos urbanos o suburbanos sin uso para consumo humano.

Tabla 1. Comparativa con los principales límites de vertido según la clasificación del cuerpo receptor que establece el Decreto N° 253/979

Parámetro	Clase 1	Clase 2a	Clase 2b	Clase 3	Clase 4
DBO ₅ (mg/L)	≤ 5	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 15
Oxígeno disuelto (mg/L)	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 2,5
Coliformes fecales (CF/100 mL)	≤ 2.000	≤ 2.000	≤ 1.000	≤ 2.000	≤ 5.000
pH	6,5 – 8,5	6,5 – 9,0	6,5 – 8,5	6,5 – 8,5	6,0 – 9,0
Sólidos suspendidos (mg/L)	—	≤ 700	----	----	≤ 1000

Además, se establecen límites para metales pesados, detergentes, fenoles, aceites y grasas, y otros contaminantes, con valores más estrictos en las clases superiores.

El artículo 11, hace referencia a los contaminantes específicos según el Decreto N° 253/979, que se aplican independientemente del tipo de cuerpo receptor (es decir, son condiciones mínimas exigidas para cualquier vertido).

Este decreto establece un marco normativo para prevenir la contaminación de las aguas, y su incumplimiento puede derivar en sanciones administrativas, civiles y eventualmente penales, dependiendo de la gravedad del daño ambiental.

El Ministerio de Ambiente provee de un sistema de multas económicas que puede imponer a quienes viertan efluentes sin cumplir los parámetros establecidos o que presenten irregularidades en sus plantas de tratamiento. Estas sanciones están previstas en el artículo 32 del decreto.

1. Desagües a colector del alcantarillado público (tabla 2)

Tabla 2. Resumen de los límites para desagües a colector del alcantarillado público.

Parámetro	Valor permitido
Material Flotante	Ausente
Temperatura	Máx. 35° C
pH	Entre 5,5 y 9,5
DBO ₅	Máx. 700 mg/L
Sólidos sedimentables	Hasta 10 mL/L determinados en cono Imhoff en 1 hora.
Aceites y grasas	Máx. 200 mg/L
Sulfuros	Máx. 5 mg/L en S

Las concentraciones de los tóxicos orgánicos no podrán exceder en 500 (quinientas) veces los valores previstos para la Clase 3.

2. Desagües directos a cursos de agua (tabla 3)

Tabla 3. Resumen de los límites para desagües directo a curso de agua

Parámetro	Valor permitido
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
DBO5	Máx. 60 mg/L
Sólidos suspendidos totales	Máx. 150 mg/L
Aceites y grasas	Máx. 50 mg/L
Sulfuros	Máx. 1 mg/L

Las concentraciones de los tóxicos orgánicos no podrán exceder las 100 (cien) veces los valores previstos para la Clase 3.

3. Desagües que se disponen por infiltración al terreno (tabla 4):

Para este tipo de desagüe hay ciertas condiciones las cuales se tienen que cumplir y son las siguientes, sólo podrá permitirse en zonas rurales; la distancia mínima a cursos de agua o pozos manantiales es de 50 m; la distancia mínima a medianeras es de 10 m; además deberán cumplir los siguientes estándares:

Tabla 4. Resumen de los límites para desagües que se disponen por infiltración al terreno.

Parámetro	Valor permitido
Material Flotante	Ausente
Temperatura	Máx. 35° C
pH	Entre 5,5 y 9,0
Sólidos Sedimentables	Hasta 10 mL/L determinados en cono Imhoff en 1 hora.
Sólidos totales	Máx. 700 mg/L
Aceites y grasas	Máx. 200 mg/L

La normativa establece valores estándar como 0,025 mg/L para el fósforo total, 0,02 mg/L para el amoníaco libre y 10 mg/L para nitratos. No obstante, se reconoce que muchos cursos de agua del país exceden sistemáticamente estos límites. La propuesta técnica de modificación elaborada por el Grupo de Estandarización Técnica Ambiental en Agua (GESTA/Agua, 2014) plantea un enfoque más integrador, que establece niveles guía en función de la preservación del ecosistema acuático, con valores objetivo más estrictos (por ejemplo, 0,5 mg/L para nitrógeno amoniacal total y 25–70 µg/L para fósforo total, según el tipo de ambiente léntico ó lótico) (tabla 5 y 6).

Tabla 5. Parámetros y valores objetivos de calidad relacionados con la calidad de agua desde el punto de vista de su estado trófico, propuesta por el GESTA para la modificación del Decreto 253/979, en 2014. (fuente: Mesa Técnica del Agua, 2017).

Parámetro	Objetivo de Calidad
pH	6,5-8,5
OD	Min. 5 mg/L
DBO ₅	5 mg/L
Aceites y grasas	Ausentes
Sustancias fenólicas	≤ 5 µg/L
Nitrógeno amoniacal total	0,5 mg/L en nitrógeno
Nitritos	0,1 mg/L como nitrógeno
Nitratos	5 mg/L como nitrógeno

La siguiente tabla resume los niveles guía propuestos para los principales parámetros tróficos en diferentes tipos de ambientes acuáticos:

Tabla 6. Parámetros y valores objetivos de calidad relacionados con la calidad de agua desde el punto de vista de su estado trófico.

Tipo de ambiente	Nitrógeno total (µg/L)	Fósforo total (µg/L)	Clorofila-a (µg/L)
Sistemas lénticos	500	30	10
Cursos de agua de hasta orden 3	650	50	10–30*
Cursos de agua de más de orden 3	1000	70	30

*Válido solo para sistemas embalsados. Fuente: DINAMA (2017)

Los valores guía funcionan como herramientas técnicas que, si bien no tienen fuerza de ley, orientan el diseño de políticas públicas y programas de manejo ambiental. Representan un criterio científico que permite anticipar el riesgo de eutrofización, tomando como referencia parámetros clave como fósforo total, nitrógeno total y clorofila-a (Mesa Técnica del Agua, 2017).

En Uruguay, la implementación de políticas orientadas a la reducción de nutrientes en cuerpos de agua ha encontrado dificultades, principalmente por la presencia del denominado “legado de fósforo” (P legacy), es decir, la acumulación histórica de este nutriente en suelos y sedimentos (Sharpley, 2015). Esta situación implica que aún ante cambios favorables en las prácticas agropecuarias, los efectos sobre la calidad del agua pueden demorarse en manifestarse.

De esta forma, la calidad de los cursos de agua y en particular la de aquellos que reciben descargas de efluentes tratados en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) está directamente vinculada con la eficiencia de los sistemas de tratamiento, así como con las características del sistema receptor. En este contexto se vuelve esencial comprender no sólo los aspectos ingenieriles de las PTARs, sino también la dinámica microbiológica que ocurre en su interior.

A continuación, se describen las características generales de las diferentes aguas residuales a tratar en las plantas de tratamiento de lodos activados seleccionadas para estudiar en esta tesis según la bibliografía (tabla 7).

Tabla 7. Rango de composiciones de aguas residuales en diferentes tipos de industrias.

Tipo de industria	DQO (mg O ₂ /L)	AGV (mg/L)	P total (mg/L)	N total (mg N/L)	S total (mg S/L)	pH	DQO/N	DQO/P
Carne	768–5200	578–1162	2–46	15–1090	1–2042	5,2–11,5	5–73	56–636
Vegetables	1992–4682	440–880	6,4–59	38–72	11–22	4,3–5,2	43–62	59–418
Cervecería	2974–5756	853–1528	5–14	13–47	2–12	6,6–7,5	86–96	227–538
Bioindustria	702–11304	65–788	8–120	25–126	6–232	5,1–8,7	28–90	25–410

Tipo de industria	DQO (mg O ₂ /L)	AGV (mg/L)	P total (mg/L)	N total (mg N/L)	S total (mg S/L)	pH	DQO/N	DQO/P
Química	561–3504	61–624	4,1–13	6–191	0–1113	6,7–9,5	20–250	176–421
Limpieza de tanques	864–5120	974–1500	2–10	9–18	18–297	4,2–8,2	75–311	304–557

Fuente: Bacterial community and filamentous population of industrial wastewater treatment plants in Belgium (Seguel et al., 2024)

Tratamiento biológico aguas residuales: sistemas aerobios y anaerobios

La depuración biológica de aguas residuales utiliza microorganismos para oxidar o transformar compuestos orgánicos y nutrientes. La literatura distingue fundamentalmente sistemas aerobios (en presencia de oxígeno) y anaerobios (ausencia de oxígeno) según el metabolismo microbiano predominante (tabla 8) (Mittal, 2011).

- Sistemas aerobios: son ampliamente aplicados en diseños como el de lodos activados, biofiltros rotatorios y reactores de lecho fijo. La aireación suministra oxígeno, favoreciendo microorganismos aerobios y promoviendo la oxidación completa de carbono orgánico a CO₂ y H₂O, junto a la formación de biomasa (Mittal, 2011).
- Sistemas anaerobios: operan sin oxígeno, con consorcios bacterianos que degradan compuestos orgánicos complejos en condiciones reductoras, generando metano, CO₂ e hidrógeno. En Uruguay, su uso es complementario y eficiente para residuos de media o alta carga orgánica, mediante procesos como UASB o digestores de lodos (Mittal, 2011).

Tabla 8. Principales diferencias entre los tratamientos aeróbicos y anaeróbicos (Fuente: Mittal, 2011).

Parámetro	Tratamiento aeróbico	Tratamiento anaeróbico
Principio del proceso	Las reacciones microbianas tienen lugar en presencia de oxígeno molecular libre. Los productos de reacción son dióxido de carbono, agua y biomasa.	Las reacciones microbianas tienen lugar en ausencia de oxígeno molecular libre. Los productos de reacción son dióxido de carbono, metano y biomasa.
Aplicaciones	Aguas residuales con impurezas orgánicas bajas a medias (DQO<1.000 ppm) y para aguas residuales que son difíciles de biodegradar, por ej, agua residuales municipales, etc.	Aguas residuales con impurezas orgánicas medias a altas (DQO>1.000 ppm) y para aguas residuales fácilmente biodegradables, por ej, agua residuales de alimentos y bebidas ricas en almidón/azúcar/alcohol.
Cinética de reacción	Relativamente rápido	Relativamente lento
Rendimiento neto de lodos	Relativamente alto	Relativamente bajo (generalmente entre una quinta y una décima parte de los procesos de tratamiento aeróbico)
Postratamiento	Normalmente descarga directa o filtración/desinfección	Invariablemente seguido de tratamiento aeróbico
Huella	Relativamente grande	Relativamente pequeño y compacto
Inversión de capital	Relativamente alto	Relativamente bajo con recuperación de la inversión
Tecnología de ejemplo	Lodos activados, por ej. aireación extendida, zanja de oxidación, MBR, procesos de película fija, por ej. Filtro percolador/biotorre, BAF, MBBR o procesos híbridos, como IFAS.	Reactor/digestor de tanque agitado continuamente, reactor de manto de lodos ascendente (UASB), reactores de lecho fluidizado de velocidad ultra alta, ej. EGSB, IC, etc.

Combinaciones de ambos sistemas, configuraciones secuenciales o integradas permiten optimizar la eficiencia, especialmente en la remoción de nutrientes, recuperación de energía y reducción de lodos.

Sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados representan una de las tecnologías más ampliamente utilizadas a nivel mundial para el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. Su principio se basa en la utilización de una comunidad microbiana aerobia y facultativa que, suspendida en el líquido, transforma la materia orgánica biodegradable y parte de los nutrientes presentes en el influente, generando biomasa microbiana (lodo biológico) y gases como dióxido de carbono (CO_2) y, eventualmente, nitrógeno (N_2) en procesos desnitrificantes (figura 1).

Principales componentes del sistema

1. Reactor biológico aeróbico

Es el núcleo del proceso, donde el efluente crudo es mezclado con biomasa activa (lodo) en presencia de oxígeno disuelto. Se promueve la oxidación de la materia orgánica, la nitrificación y, dependiendo del diseño, puede integrarse también una etapa anóxica o anaeróbica previa.

2. Sistema de aireación

Su función es suministrar oxígeno disuelto y agitación. Puede utilizarse aireación mecánica superficial (pala rotativa o turbina), difusión de aire por burbujeo (fino o grueso), o aireadores híbridos. El nivel óptimo de oxígeno disuelto debe mantenerse alrededor de 2 mg/L.

3. Sedimentador secundario o clarificador

Separa el lodo biológico del efluente tratado. La biomasa sedimentada es parcialmente recirculada al reactor (lodo de retorno o RAS) y el excedente se purga (lodo residual o WAS). La eficiencia del clarificador está directamente relacionada con la calidad del flóculo y el control del bulking.

4. Sistema de recirculación de lodo

Controla la edad del lodo (SRT) y la relación lodo/sustrato (F/M). La recirculación permite mantener una biomasa estable y seleccionar comunidades bacterianas eficientes.

5. Zona de selector o tanque selector (opcional)

Algunas configuraciones incluyen una zona de contacto anóxica o aeróbica previa que permite controlar selectivamente poblaciones microbianas indeseadas, como las filamentosas asociadas al bulking.

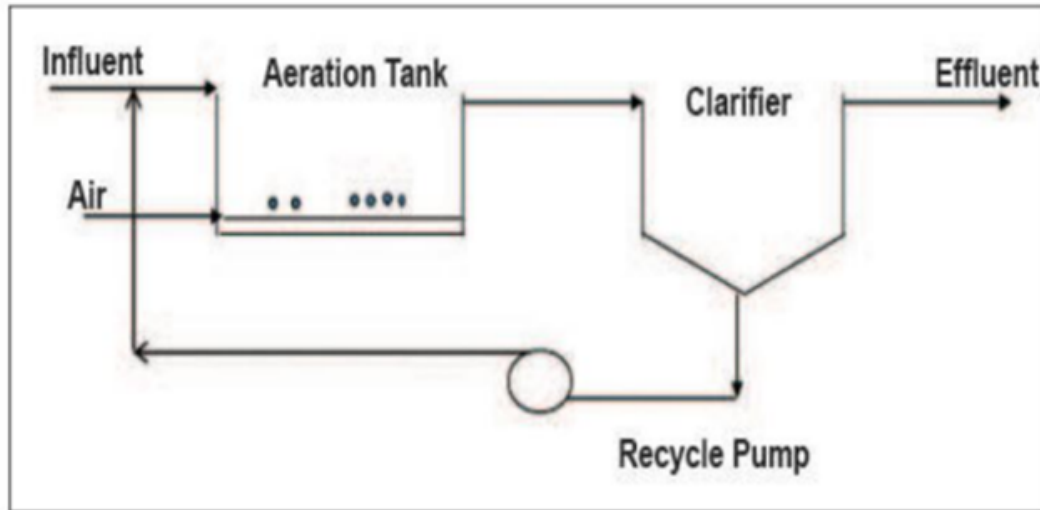


Figura 1. Sistema de proceso convencional de lodos activados (ASP) Fuente: Biological Wastewater Treatment (Mittal, 2011).

Principio de funcionamiento

El proceso puede dividirse en tres fases principales:

- Interacción entre efluente y biomasa biológica: el agua residual se mezcla con el lodo activado bajo aireación, promoviendo la degradación de materia orgánica y nitrógeno.
- Sedimentación - separación sólido-líquido: el flóculo biológico sedimenta en el clarificador, separando efluente tratado y biomasa.
- Recirculación de lodo o biomasa: el lodo sedimentado se recircula al reactor para mantener la biomasa activa.

Ventajas y desafíos

- Ventajas: elevada eficiencia en remoción de DBO_5 ($> 90\%$), nitrificación y potencial para la remoción biológica de nutrientes en configuraciones extendidas (Biological Nutrient Removal, BNR).

- Desafíos: formación de bulking filamentoso, espuma, alto consumo energético por aireación, necesidad de control microbiológico y operacional riguroso.

La configuración y el control del sistema de lodos activados condicionan directamente la estructura microbiana, especialmente en lo que refiere a filamentos como los del filo *Chloroflexota*. De allí la importancia de comprender su ecología, abundancia relativa y estrategias de control.

Microbiología del sistema de lodos activados y floculación

El proceso de lodos activados se basa en la formación de flóculos: conglomerados de bacterias, protozoos y filamentos, que sedimentan eficientemente, separando la biomasa del efluente. La floculación está asociada a una estructura de tipo andamiaje proporcionada por bacterias filamentosas, que generan la cohesión flóculo-flóculo permitiendo la retención de sólidos en el reactor (Speirs et al., 2019).

Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados

Las bacterias filamentosas suelen mantenerse en el núcleo de los flóculos. Sin embargo, en situaciones de estrés, como en aguas residuales con una baja relación sustrato/microorganismo (F/M) y bajos niveles de oxígeno disuelto (OD), tienden a elongar sus filamentos para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Este fenómeno conduce a una dominancia sobre las bacterias floculantes y, como resultado, se manifiesta el fenómeno del bulking filamentoso (Balcárcel et al., 2014).

Las bacterias filamentosas desempeñan un papel crucial al constituir la estructura de sostén del cual se agregan las bacterias que forman los flóculos. Esto es posible debido a la presencia de sustancias poliméricas extracelulares producidas por estas últimas, las cuales mantienen la firmeza y la estructura compacta del flóculo, lo cual es deseado para la operación de las plantas de tratamiento de aguas residuales (figura 2). No obstante, un crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos no es tan deseable, debilita los flóculos, dejándolos más abiertos y con espacios internos (figura 3). Esto tiene un impacto negativo en las propiedades del lodo, volviéndolo menos denso y más esponjoso (Balcárcel et al., 2014).

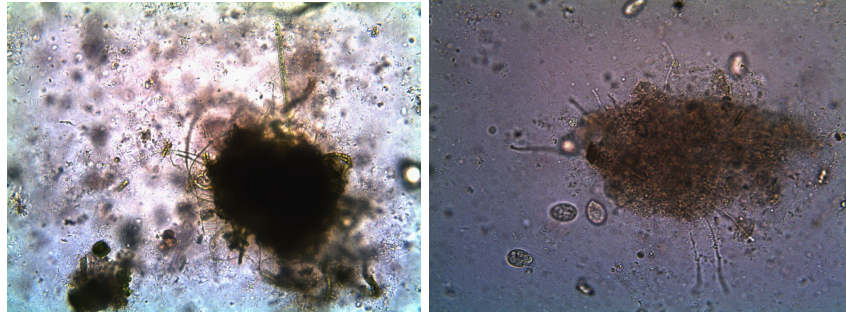


Figura 2. Microfotografía mostrando la estructura de un flóculo ideal, redondeados, compactos y firmes. (imagen: del autor)

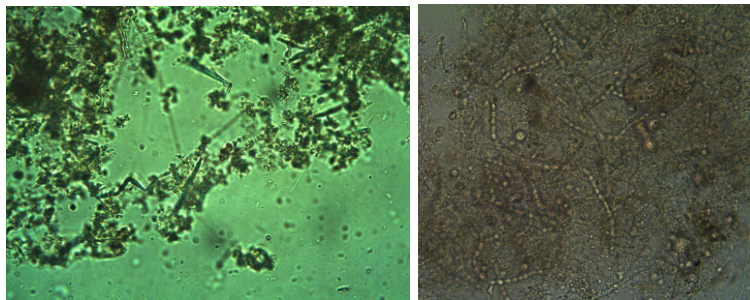


Figura 3. Microfotografía mostrando la estructura de flóculos no ideales, muy disgregados y separados, no compactos. (imagen del autor)

El proyecto internacional Microbial Database for Activated Sludge (MiDAS) desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Per Halkjær Nielsen en el Centro de Ecología Microbiana de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) cuyo última versión es MiDAS 5, ha sido fundamental para la caracterización de estas comunidades, permitiendo identificar géneros y especies claves mediante el análisis de secuencias del gen del ARNr 16S y es una herramienta que ha sido clave para mapear taxonómicamente comunidades de PTAR a escala global (Speirs et. al., 2019, Dueholm et al., 2024).

En este proyecto se tomaron muestras de 740 PTAR de 31 países, se utilizó una metodología especial para secuenciar el gen del ARNr de 16S de forma completa (Dueholm et al., 2022). Con estos datos se construyó una base de datos de estas secuencias agrupandolas de acuerdo a su similitud, las secuencias se caracterizaron utilizando la base de datos de SILVA-138, cuando no fue posible la asignación de género y especie mediante esta caracterización, se asignó un código numérico que permite comparar los resultados obtenidos en las diferentes PTAR. Los resultados muestran que las secuencias se clasificaron dentro los filos Proteobacteria, Bacteroidota,

Planctomycetota, Firmicutes, Actinobacteriota, Chloroflexi, Patescibacteria y Mixococcota, una gran mayoría de estas secuencias se asignaron a nuevos grupos taxonómicos (Duelholm et al., 2022) (figura 4).

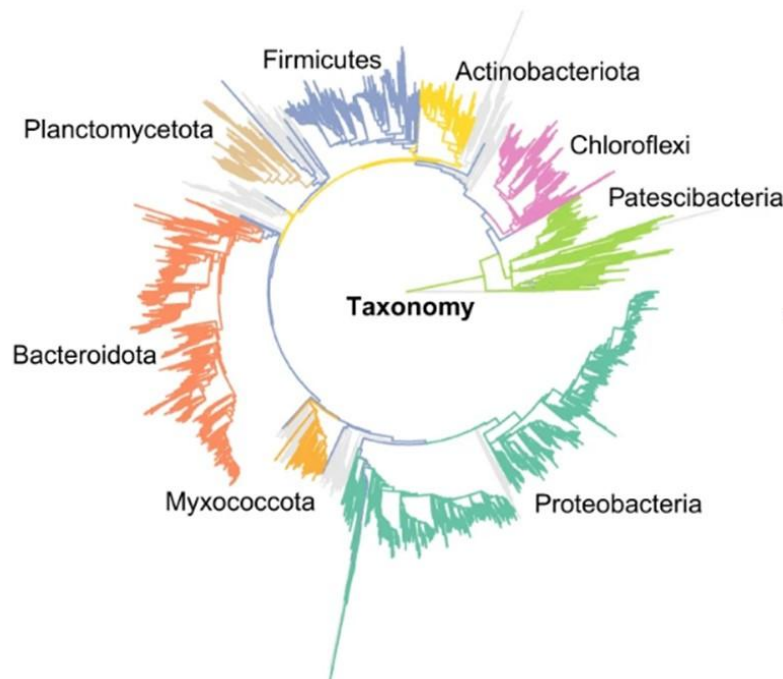


Figura 4. Árbol filogenético construido con las secuencias obtenidas de las PTARs muestreadas en el proyecto MiDAS. Fuente: MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. Duelholm et al., 2022

Otra gran ventaja de esta base de datos es que se incluyó la función de los microorganismos de acuerdo a la bibliografía, por lo tanto es posible conocer los grupos taxonómicos y su función. En algunos casos esta información se complementa con información de la morfología utilizando la técnica de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y análisis de los genomas recuperados de metagenomas (Petriglieri et al., 2023).

Bulking filamentoso: causas y control

¿Qué es el bulking y cómo se detecta?

El fenómeno de bulking filamentoso se define como un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas que generan flóculos con puentes interfloculares y baja compactación, reduciendo

la eficiencia de sedimentación, produciendo problemas operativos. Esto reduce la eficiencia del clarificador, aumenta los sólidos en suspensión y compromete la calidad del efluente. (Petriglieri et al., 2023).

Las causas comunes incluyen:

- Niveles bajos de oxígeno disuelto.
- Alta relación F/M (flujo/sustrato).
- Carga orgánica inadecuada.
- Proliferación de ciertos filamentos como *Candidatus Promineofilum* o *Ca. Kouleothrix*.

Los métodos de control incluyen:

- Ajustes operacionales (ajuste de tiempos de retención de lodo (SRT), control de carga orgánica y nutrientes, manejo de la relación oxígeno/sustrato (Demanda de Oxígeno, DO) según manuales como los de Jenkins y Wanner (2014).
- El uso de manuales técnicos ampliamente utilizados en el ámbito del tratamiento biológico de aguas residuales, como los de Jenkins y Wanner (2014), son herramientas en el cual se han sistematizado los conocimientos sobre los problemas operacionales más frecuentes en sistemas de lodos activados. Estos incluyen el bulking filamentoso y el espumado, fenómenos comúnmente asociados al crecimiento de bacterias filamentosas como *Microthrix parvicella* y ciertas especies del filo Chloroflexota.
- Uso de reactores seleccionados para el tratamiento.
- Tratamientos químicos (cloro, peróxido de hidrógeno).
- Detección temprana mediante FISH, que permite identificar morfotipos como Eikelboom 0092 o 1851 combinada con microscopía (Speirs et al., 2019).

Además de la microscopía tradicional también es utilizado el índice volumétrico de lodos en inglés Sludge Volume Index (SVI), este índice se calcula midiendo el volumen de lodo sedimentado luego de 30 minutos en cono Imhoff, y se divide por los g de sólidos suspendidos volátiles del lodo. Se ha establecido que lodos con un SVI > 150 mL/g manifiestan problemas de sedimentabilidad (Caluwé et al., 2017).

Esto suele estar asociado a fenómenos como:

- Bulking filamentoso: como ya se mencionó, crecimiento excesivo de bacterias filamentosas que impiden la compactación del lodo.
- Baja densidad del lodo: lodos más ligeros que flotan o se dispersan fácilmente.

Microorganismos causantes de bulking según MiDAS y estudios vinculados

De acuerdo a la base de datos MiDAS, existe una gran diversidad de microorganismos que presentan morfología filamentosa y que forman parte de las comunidades microbianas de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Estos microorganismos son fundamentales para formar los flocúlos pero un crecimiento excesivo de ellos puede producir problemas de bulking filamentoso. Poder caracterizar cuáles son los microorganismos responsables del bulking es uno de los grandes desafíos de la microbiología de sistemas de lodos activados. Según los datos recopilados en MiDAS se detectaron unos 20 géneros de microorganismos filamentosos, dentro de ellos los más abundantes fueron *Ca. Microthrix*, *Leptothrix*, *Ca. Villigracilis*, *Trichococcus* y *Sphaerotilus*, todos estos géneros han sido reportados como causantes de bulking filamentoso. *Ca. Microthrix* y *Leptothrix* fueron más comunes en Europa y menos abundantes en Asia y América (figura 5) (Dueholm et al., 2022).

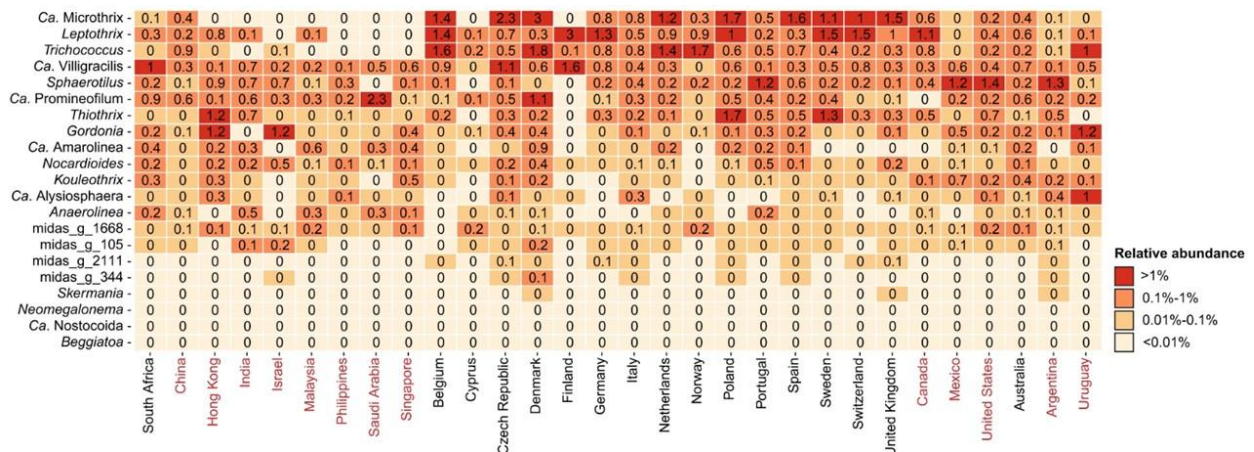


Figura 5. Diversidad global de organismos filamentosos. Fuente: MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. Extraído de Dueholm et al., 2022.

Utilizando la base de datos de MiDAS y estudios metagenómicos se han identificado bacterias filamentosas del filo Chloroflexota (morfotipos Eikelboom 0092, 1851, 021N), incluyendo *Ca. Promineofilum breve* (morfotipo 0092), *Ca. Kouleothrix*, como responsables del bulking en una PTAR con remoción de nutrientes (Sam et al., 2022). *Ca. Promineofilum breve*, fue identificado mediante ensamblado de genomas a partir de metagenomas y FISH como el morfotipo 0092, bacteria filamentosas causante de bulking según el manual de Jenkins (McIlroy et al., 2017). *Ca. Kouleothrix* también se ha asociado a procesos de bulking en ese mismo contexto (Nittami et al., 2017).

Microorganismos del filo Chloroflexota

La historia taxonómica del filo Chloroflexota (anteriormente Chloroflexi) refleja el avance metodológico desde la taxonomía fenotípica hacia una sistemática molecular apoyada en filogenia del gen del ARNr 16S y, más recientemente, en genómica comparativa y ensamblado de genomas a partir de metagenomas (MAGs).

Del nombre Chloroflexi a Chloroflexota

El filo fue descrito originalmente como Chloroflexi por Garrity y Holt en 2001, en honor al género tipo *Chloroflexus*, una bacteria verde no sulfurosa fototrófica. A medida que se incorporaron nuevos representantes, se hizo evidente que el filo abarcaba grupos no fototróficos y filamentosos con metabolismos fermentativos, como las clases Anaerolineae y Caldilineae (Yamada et al., 2005; Sekiguchi et al., 1999, 2000).

No obstante, el uso del sufijo *-i* en Chloroflexi no seguía la convención actualizada para filos bacterianos. En respuesta, el Genome Taxonomy Database (GTDB) y posteriormente SILVA propusieron el nombre actualizado Chloroflexota, incorporando la terminación *-ota* establecida por el Comité Internacional de Nomenclatura de Procariotas (ICSP) para la jerarquía taxonómica de filos (Parks et al., 2020).

Este cambio fue adoptado por bases de datos taxonómicas como MiDAS 4 (Dueholm et al., 2022), que catalogan la diversidad microbiana en sistemas de tratamiento de aguas residuales

mediante secuencias completas de genes del ARNr de 16S, sin embargo otras bases de datos como SILVA 138 está desactualizada y sigue nombrando el filo como Chloroflexi.

Clases incluídas dentro del filo Chloroflexota

El filo Chloroflexota incluye diversas clases, muchas de las cuales se encuentran en reactores de tratamiento de aguas residuales (tabla 9).

Tabla 9. Diferentes clases dentro del filo Chloroflexota, sus características y los ambientes más frecuentes donde se han detectado según lo reportado por Thiel et al. (2019) y Speirs et al. (2019).

Clase	Características principales	Ambientes frecuentes
Chloroflexia	Fototróficos anoxigénicos, flagelados	Fuentes termales, ambientes salinos
Anaerolineae	Filamentos fermentativos, no móviles	Lodos activados, digestores
Caldilineae	Filamentos ramificados, aerotolerantes	Lodos activados, aguas residuales
Thermomicrobia	Aerobios, termófilos, degradadores de polímeros	Compost, ambientes calientes
Ktedonobacteria	Aerobios, formadores de esporas, ricos en suelos ácidos	Suelos volcánicos, ambientes forestales

Cabe destacar que la mayoría de los estudios funcionales y morfológicos en PTAR se enfocan en las clases Anaerolineae y Caldilineae, dado su papel estructural en los flóculos, su morfología filamentosa y su capacidad de fermentar carbohidratos simples (Yoon et al., 2010; Björnsson et al., 2002; Speirs et al., 2019).

Géneros de relevancia en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Según la base de datos de MiDAS 4 y estudios recientes los géneros más reportados en sistemas sam de tratamiento de aguas residuales son:

- *Ca. Promineofilum* (morfortipo 0092 según el manual de Jenkins), presenta morfología filamentosa, fermentador anaeróbico (Petriglieri et al., 2023; McIlroy et al., 2016).
- *Ca. Kouleothrix* (morfortipo 1851 según el manual de Jenkins), forma puentes interfloculares y se asocia al bulking (Nittami et al., 2017).
- *Ca. Defluviifilum* (morfortipo 0803 según el manual de Jenkins) presenta morfología de filamento que se encuentra en la superficie del flóculo, puede contribuir al bulking en exceso (Nittami et al., 2017).
- *Ca. Amarolinea*, *Ca. Villigracilis* y *Nitrolancea hollandica* han sido reconocidos por su rol en la degradación y transformación de compuestos nitrogenados (Bovio-Winkler et al., 2023).

Por otro lado, los trabajos de Björnsson et al. (2002) y de Speirs et al. (2019) identificaron diversas bacterias filamentosas del filo Chloroflexota (como *Ca. Kouleothrix*, *Ca. Defluviifilum*, *Ca. Promineofilum*, *Ca. Sarcinithrix*) asociados a eventos de bulking (Speirs et. al., 2019).

Según el trabajo de Speirs et al., 2019, el filo Chloroflexota se encuentra siempre presente en sistemas de lodos activados para remoción de nitrógeno y fósforo y debido a su morfología filamentosa funcionan como una red o estructura de andamiaje del flóculo. Además desempeñan un rol importante ya que fermentan carbohidratos y polímeros complejos, liberando compuestos que promueven el desarrollo de otras bacterias. Pero también se ha reportado que en algunos casos se expanden fuera de los flóculos promoviendo el bulking. Comprendiendo la taxonomía y su funcionalidad operativa, se evidencian oportunidades para manipular su abundancia y prevenir fenómenos de bulking sin afectar los procesos de depuración.

Detección de microorganismos del filo Chloroflexota por técnica de FISH y qPCR en sistemas de tratamiento de aguas residuales

El uso de técnicas de FISH ha transformado el estudio de bacterias filamentosas en lodos activados ya que se han desarrollado sondas específicas para géneros permitiendo identificar con precisión las especies de microorganismos filamentosos y su ubicación en los flóculos. La aplicación de FISH cuantitativo ha demostrado que altos niveles de filamentos del filo Chloroflexota se correlacionan con altos índices SVI y problemas de bulking.

En la bibliografía hay varios trabajos que reportan el diseño de sondas específicas para diferentes microorganismos filamentosos del filo Chloroflexota (tabla 7). Por ejemplo, el trabajo de Nittami et al., (2020) reporta el diseño de la sonda CHL1851 para *Ca. Kouleothrix* (morfofoto Eikelboom 1851), validando su especificidad mediante hibridación con la sonda EUBmix (sonda universal) y sondas específicas para otros filamentos como *Ca. Defluviifilum*. También se desarrollaron sondas como CFX197 para el morfofoto Eikelboom 0092, demostrando su unión específica en lodos de plantas de tratamiento en Australia (Speirs et al., 2019).

En el trabajo de Nittami y colaboradores (2017) se observó que *Ca. Kouleothrix* se disponía formando puentes interfloclares, estructura típica del bulking, con filamentos que se entrelazan con otros filamentos. Este trabajo complementa la cuantificación utilizando qPCR específico para el gen del ARNr 16S de *Ca. Kouleothrix*, evidenciando correlaciones altas entre abundancia de filamentos ($> E+05$ copias/ng ADN) y SVI (> 250 mL/g). Mediante estas técnicas se pudo confirmar el vínculo directo entre proliferación filamentososa y deterioro de la sedimentabilidad del fango.

En el trabajo de Kragelund y colaboradores (2007) se diseñaron sondas para *Ca. Defluviifilum* (morfofoto 0803), localizando filamentos en la superficie de los flóculos. Por otro lado, en sistemas de tratamiento de aguas residuales de Dinamarca, Seviour et al. (2010) y Nierychlo et al. (2020) emplearon sondas del catálogo MiDAS (tabla 10), incluyendo las dirigidas a *Ca. Promineofilum* y *Ca. Amarolinea*, mostrando flóculos integrados que no comprometen explícitamente la sedimentabilidad (Petriglieri et al., 2023).

Tabla 10. Sondas de FISH diseñadas para diferentes grupos de microorganismos filamentosos del filo Chloroflexota.

Sonda	Microorganismo blanco	Referencia
CHL1851	<i>Kouleothrix</i> (Eikelboom type 1851)	Beer et al., 2002
CFX197	<i>Candidatus Promineofilum</i> (Eikelboom type 0092 Brachythrux)	Speirs et al., 2009
CFX67 CFX449/CFX1151	<i>Candidatus Sarcinithrix</i> (Eikelboom type 0914)	Speirs et al., 2011; Nierychlo et al., 2019

Sonda	Microorganismo blanco	Referencia
CFX841	<i>midas_g_2111</i> (Filamentous Ardenticatenia)	Speirs et al., 2015, 2019
CFX194b	<i>midas_g_105</i> (<i>Ca. Amarithrix</i> - type 0675)	Speirs et al., 2017, 2019
CFX86a	<i>midas_g_344</i> (<i>Ca. Catenibacter</i> - type 0041)	Speirs et al., 2017, 2019
CFX86b	<i>midas_g_1668</i> (<i>Ca. Catenibacter</i> - type 0041)	Speirs et al., 2017, 2019
CFX64	<i>Candidatus Amarolinea</i> (Eikelboom type 0092)	Nierychlo et al., 2019
CFX763	<i>Candidatus Villigracilis</i>	Nierychlo et al., 2019
CFX64	<i>Anaerolinea</i>	(Nierychlo et al., 2019; Sekiguchi et al. 2003)
CFX1243, CFXmix, EUBmix	<i>midas_g_5463</i> (parte del género <i>Ca_Defluviifilum</i>)	(Petriglieri et al., 2023)
CFX166, CFXmix, EUBmix2	<i>Ca_Tricholinea</i> (antes <i>midas_g_9648</i>)	(Petriglieri et al., 2023)

Avances metagenómicos y caracterización funcional

A pesar de que el filo Chloroflexota se detecta frecuentemente en sistemas de tratamiento de aguas residuales, se desconocen muchas de sus funciones y relevancia en los sistemas, parte de la gran dificultad en su conocimiento es debido a las dificultades a la hora de obtener cultivos puro o aislados. La aparición de tecnologías de secuenciación masiva, junto al ensamblado de MAGs, permitió descubrir que muchas especies dentro del filo Chloroflexota las cuales no habían sido previamente cultivadas. Esto habilitó la identificación de géneros candidatos “*Candidatus*”, como *Ca. Promineofilum*, *Ca. Defluviifilum* o *Ca. Kouleothrix*, y su asignación funcional dentro de los sistemas de tratamiento (Speirs et al., 2019; Bovio-Winkler et al., 2023).

En la actualidad se han podido aislar y describir microorganismos del filo Chloroflexota dentro de ocho clases que son Anaerolineae, Ardenticatenia, Caldilineae, Chloroflexia, Dehalococcoidia, Ktedonobacteria, Thermoflexia y Thermomicrobia (figura 6) (Bovio-Winkler et al., 2018). Y se estima que hay entre 25 y 30 clases sin cultivar, dentro del filo (Thiel et al., 2019).

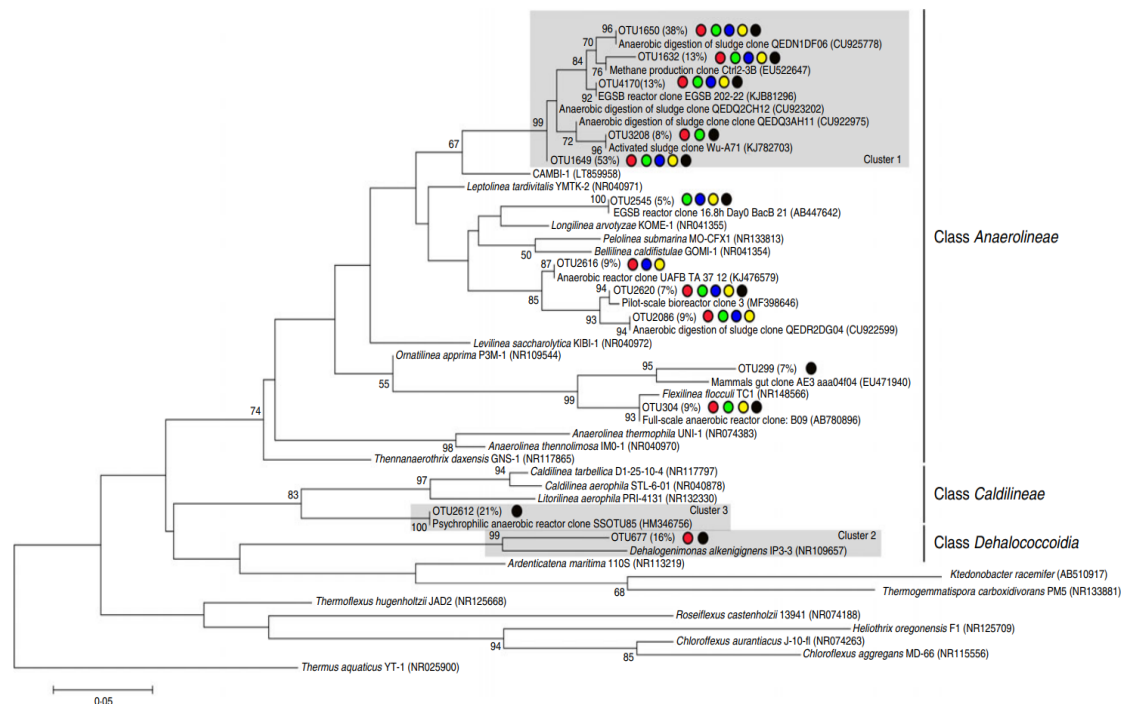


Figura. 6 - Árbol del filo Chloroflexota construido en base a la secuencia del gen ARNr de 16S, incluyendo clones ambientales, representantes cultivados pertenecientes al filo Chloroflexota y secuencias de OTUs clasificadas dentro del filo Chloroflexota. Se muestran los valores de bootstrap ($> 50\%$) obtenidos con el método de máxima verosimilitud basado en 1.000 replicaciones en los nodos de las ramas. *Thermus aquaticus* YT-1 fue utilizado como grupo externo. La barra indica 0,05 sustituciones por sitio. La abundancia relativa de las OTUs en las muestras se muestra entre corchetes. Se identificó cada reactor con una etiqueta diferente. Solo se utilizaron en el análisis las OTUs que superan el 5 %. Extraído de Bovio-Winkler et al., 2018.

Este enfoque de análisis de genomas, apoyado por proyectos como MiDAS, mostró que los microorganismos del filo Chloroflexota presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales no solo tienen capacidad fermentativa, sino que también tiene importancia en la producción de exopolisacáridos (EPS), la formación y estructura de flóculos, algunos de ellos tienen rutas de

respiración alternativa (nitrato, óxidos de nitrógeno), almacenamiento de glucógeno, hidrólisis de polímeros, etc. (Bovio-Winkler et al., 2023).

En la tabla 11, se presenta un resumen de los diferentes trabajos que se han realizado en la caracterización de organismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 11. Resumen de hitos en la caracterización de microorganismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Año	Hito
2002	Diseño de sondas FISH para Eikelboom 0092 (Speirs et al. 2002)
2009	Refuerzo de clasificación de 0092 como filo Chloroflexota (Speirs et al., 2009).
2011	Descripción de <i>Ca. Defluviifilum</i> (0803) y su localización (Kragelund et al., 2011)
2018	Creación de la base de datos de MiDAS y análisis filogenético
2020	Diseño de la sonda CHL1851 que identifica <i>Ca. Kouleothrix</i> y confirma su rol en bulking (Nittami et al., 2020)
2023	MAGs representan roles funcionales diversos en PTAR y digestores (Petriglieri et al., 2023, Bovio-Winkler et al. 2023)

Antecedentes

En la actualidad, se observa un incremento significativo en la demanda de procedimientos para el tratamiento de efluentes en instalaciones destinadas al tratamiento de aguas residuales e industriales. Este aumento de interés se fundamenta en múltiples factores, entre ellos la preservación de los recursos naturales, la estricta conformidad con las regulaciones en vigor y la oportunidad de generar productos con valor añadido (López, 2016).

En el contexto de la biotecnología aplicada al ámbito agroindustrial y ambiental, Uruguay ha emergido debido a su compromiso con la optimización de los sistemas de tratamiento de aguas

residuales. Nuestro país, reconocido por su destacada industria agroalimentaria, ha reconocido la importancia crucial de la gestión sostenible del recurso hídrico para mantener la integridad ambiental y la prosperidad económica. La adecuada gestión de las aguas residuales provenientes de fuentes domésticas e industriales es de vital importancia para de alguna forma mitigar los niveles potencialmente nocivos de compuestos orgánicos e inorgánicos, así como de microorganismos patógenos. Estos sistemas permiten la disposición de las aguas tratadas en cuerpos receptores, sin comprometer la capacidad de autopurificación de dichos cuerpos de agua (Gaget et al., 2017).

Métodos de biología molecular para el estudio de microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales

En los últimos 30 años se ha comenzado a comprender la microbiología de los lodos activados, un resultado que coincide con el desarrollo de métodos moleculares independientes del cultivo (Nielsen y McMahon, 2014). El desarrollo de las técnicas de PCR, la clonación y la secuenciación del ADN de Sanger permitió dilucidar las composiciones de las comunidades de lodos activados, sin necesidad de cultivar miembros individuales, basándose en cambio en el uso de análisis de secuencias de genes ARNr 23S y 16S utilizados como marcadores filogenéticos (Nielsen y McMahon, 2014) .

Entre estas técnicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser especialmente útil al facilitar la detección semicuantitativa de genes específicos de distintas cepas bacterianas individuales, incluso en concentraciones extremadamente bajas (Cotto et al., 2015).

Más recientemente, la PCR cuantitativa, conocida como qPCR, se ha empleado para realizar mediciones precisas de la cantidad de bacterias a través de la información genómica. Esta técnica de cuantificación tiene el potencial de ser una alternativa a otras metodologías empleadas para cuantificar biomasa. Un aspecto de gran relevancia es que la qPCR proporciona información cuantitativa precisa acerca de la presencia de genes específicos en cultivos mixtos o muestras ambientales (Cotto et al., 2015).

El diseño de las sondas de oligonucleótidos marcadas con compuestos fluorescentes dirigidas a secuencias de ARN ribosomal de poblaciones de interés, permitió la identificación de células individuales mediante técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH; Fluorescence *in situ* hybridization, por sus siglas en inglés) (Amann y Fuchs, 2008; Nielsen et al., 2009; Seviour, 2010).

En combinación con la tinción histoquímica, la micro autorradiografía (MAR) (McIlroy et al., 2017), ha aclarado la ecofisiología *in situ* y las posibles funciones de las poblaciones individuales analizadas a nivel de células individuales. Dichos datos han revelado la verdadera biodiversidad de las comunidades de lodos activados y la presencia de poblaciones previamente desconocidas que existen allí, incluido el filo Chloroflexota, donde la mayoría aún no se ha cultivado (Speirs et al., 2019), así también como su morfología.

Antecedentes del tema en el grupo de investigación

El Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) ha llevado a cabo una investigación prolongada en el ámbito de la microbiología de sistemas de tratamiento de aguas residuales. En colaboración con grupos de investigación tanto nacionales como internacionales de América Latina y Europa, se han abordado diversos proyectos relacionados con sistemas anaerobios metanogénicos, producción de hidrógeno y remoción de nitrógeno, entre otros (Castelló et al., 2009; Perna et al., 2013; Costa et al., 2014, Júnior et al., 2015; Callejas et al., 2019; Cabezas et al., 2020).

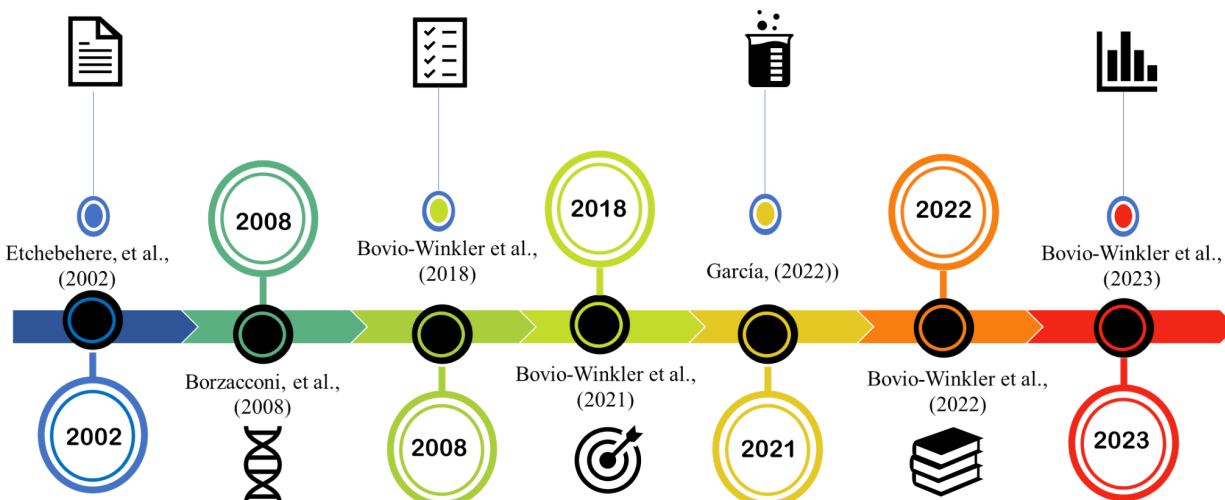


Figura 7- Esquema cronológico que muestra los antecedentes del grupo de investigación en el estudio de microorganismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Durante este extenso período de investigación, se observó consistentemente la presencia del filo Chloroflexota en los diferentes reactores estudiados, pero aún quedan muchas incógnitas sobre el rol de estos microorganismos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

El interés en el filo Chloroflexota se inició con el trabajo de Tesis de la Dra. Etchebehere en 2002 (figura 7), donde se identificaron dentro de un reactor desnitrificante escala laboratorio alimentado con lixiviado de relleno sanitario. Posteriormente, se detectó un sobrecrecimiento de bacterias filamentosas, incluyendo Chloroflexota, en un reactor metanogénico industrial en 2008, lo que motivó un estudio más profundo en reactores a escala real (Borzacconi et al., 2008). Estudios posteriores revelaron la presencia de bacterias Chloroflexota en sistemas aerobios de lodos activados, tanto a nivel local como internacional (Bovio-Winkler et al., 2019; Wu et al., 2019).

A pesar de la abundancia y diversidad del filo Chloroflexota detectada en estos sistemas, su función aún no ha sido completamente esclarecida. Para abordar esta pregunta, se ha empleado una combinación de técnicas moleculares avanzadas, incluyendo la secuenciación de genomas de

células individuales y metagenomas, así como el análisis de metatranscriptomas (Dam et al., 2020).

Los trabajos más recientes publicados por el laboratorio (tabla 12) se han centrado en el análisis de poblaciones del filo *Chloroflexota* principalmente en reactores anaerobios. En el trabajo de Bovio-Winkler et al. (2018) se estudiaron cinco reactores anaerobios de manto de lodos de flujo ascendente (UASB) a escala real de tratamiento de efluentes industriales en Uruguay. Este filo microbiano se identificó como uno de los grupos bacterianos más abundantes en los reactores. Mediante técnicas de qPCR, T-RFLP, secuenciación para el gen ARNr de 16S y FISH, se detectó una alta abundancia y diversidad del filo *Chloroflexota*, particularmente de la clase *Anaerolineae*, en todos los reactores estudiados. La morfología filamentosa de estos microorganismos sugiere un rol clave en la formación de gránulos en los reactores UASB. Además, se observó que la diversidad estaba más influenciada por el inóculo que por el tipo de efluente, y que existía una correlación positiva entre la abundancia del filo *Chloroflexota* y parámetros operativos como la carga orgánica o la biomasa presente. Se postuló una asociación entre su morfología filamentosa y su posible participación estructural en la formación de gránulos, aunque también se reportó su implicancia en episodios de bulking filamentoso anaerobio (Borzacconi et al., 2008). Este fenómeno puede comprometer severamente la sedimentabilidad del lodo y, por ende, la eficiencia del tratamiento. El trabajo plantea que aunque los miembros de la clase *Anaerolineae* predominan y muestran estabilidad temporal en los reactores, la mayoría pertenecen a grupos no cultivados, lo que limita la comprensión de su fisiología y función ecológica. También destaca la necesidad de nuevas aproximaciones metodológicas y del análisis de episodios de bulking para comprender plenamente su papel en la biomasa de los reactores. Estos hallazgos tienen implicancias operativas importantes, ya que el conocimiento del rol de filo *Chloroflexota* podría mejorar el diseño y mantenimiento de los sistemas UASB, previniendo problemas de sedimentación o pérdida de biomasa.

Más adelante, en 2021 se realizó un estudio de meta-análisis de datos generados por secuenciación del gen ARNr de 16S de 62 reactores metanogénicos a escala real, tratando distintos tipos de residuos líquidos (WTARs) y sólidos (STARs) alrededor del mundo. El objetivo fue evaluar la abundancia, diversidad y filogenia del filo *Chloroflexota*, particularmente de la clase *Anaerolineae*, grupo altamente prevalente pero escasamente comprendido por la falta

de representantes cultivados. Se detectó que el filo Chloroflexota fue más abundante en WTARs, en especial aquellos con biomasa granular. Cuatro géneros dominaron en ambos tipos de reactores (*Bellilinea*, *Leptolinea* y dos sin representantes cultivados identificados como *midas_g_156* y *midas_g_467*). Sin embargo, los reactores presentaban núcleos microbianos distintos, lo que indica que el tipo de reactor influye en la selección de las poblaciones de bacterias del filo Chloroflexota. Además, se observó una correlación significativa entre la abundancia del filo Chloroflexota y de Euryarchaeota (arqueas metanogénicas), lo que sugiere sintrofia entre estos grupos de microorganismos (Bovio-Winkler et al. 2021).

El estudio también subraya las limitaciones al comparar datos generados por distintos sets de primers y plataformas de secuenciación. Se concluye que Anaerolineae juega un rol clave en la digestión anaerobia tanto por su morfología filamentosa (facilitando la formación de gránulos) como por sus posibles capacidades fermentativas. Los autores postulan la necesidad de estandarizar metadatos, técnicas bioinformáticas y profundizar en estudios metagenómicos y metatranscriptómicos para esclarecer la función ecológica de este filo en los reactores anaeróbicos (Bovio-Winkler et al. 2021).

Luego en 2023 se publicó un artículo en que se proporciona una visión metagenómica centrada en la diversidad y el potencial funcional del filo Chloroflexota en tres tipos de reactores del tipo UASB metanogénico a escala real, un reactor de lodos activados también a escala real y un reactor anammox a escala laboratorio. Se reconstruyeron 17 genomas de especies nuevas, incluyendo dos géneros nuevos propuestos como *Candidatus* dentro de las clases Dehalococcoidia y Anaerolineae y una nueva especie del género *Ca. Villigracilis* representando el primer genoma representativo dentro de este género (propuesta taxonómica *Ca. Villigracilis nielsenii* sp. nov.) (Bovio-Winkler et al. 2023).

A pesar de las diferencias ambientales entre los sistemas, los genomas mostraron características metabólicas compartidas como metabolismo anaerobio, rutas fermentativas y genes que codifican enzimas hidrolíticas. En el caso del reactor anammox, se encontraron genes relacionados con la conversión de nitrógeno, lo que sugiere una participación activa en procesos de desnitrificación parcial, favoreciendo el rendimiento global del proceso de remoción de nitrógeno. También se observaron genes asociados con adhesividad celular y producción de

exopolisacáridos, que junto a la morfología filamentosa corroborada por FISH, implican un rol estructural del filo Chloroflexota en la agregación de biomasa (flóculos y gránulos). Esto refuerza su posible implicación en fenómenos como bulking. Además, se identificó redundancia funcional entre especies, lo que podría otorgar resiliencia frente a disturbios operacionales (Bovio-Winkler et al. 2023).

Los hallazgos destacan la versatilidad fisiológica de este filo y su adaptación a distintos sistemas de tratamiento de aguas residuales. El estudio propone expandir el aislamiento y caracterización de especies cultivables para clarificar su rol ecológico y su impacto sobre el rendimiento del tratamiento, con aplicaciones prácticas en el control de procesos como el fenómeno bulking filamentoso (Bovio-Winkler et al. 2023).

Aunque se han logrado avances significativos en el conocimiento de los microorganismos del filo Chloroflexota, aún existe una limitada cantidad de información respecto a los sistemas de tratamiento de aguas residuales en nuestro país. Los estudios previos han sido puntuales y se han centrado en dos plantas de tratamiento de lodos activados que presentaron problemas de bulking. En este contexto, la presente tesis de posgrado propone ampliar el conocimiento sobre los microorganismos del filo Chloroflexota en los sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados que operan en Uruguay.

Esta investigación se enmarca en el proyecto FCE_1_2021_1_166934, cuyo objetivo fue caracterizar la diversidad, abundancia y función de los microorganismos del filo Chloroflexota en estos sistemas, así como en el proyecto ANII-FMV_1_2021_1_16605, cuyo propósito fue identificar los microorganismos responsables de problemas de sedimentación en plantas de tratamiento de aguas residuales en el país.

Bajo la dirección de la Dra. Angela Cabezas y en el marco de la tesis de posgrado de la Ing. Mariana Perroud, surge la oportunidad de monitorear diversas plantas de lodos activados en funcionamiento en Uruguay, contribuyendo así al conocimiento y manejo de estos sistemas en nuestro contexto nacional.

Tabla 12. Comparación de estudios más recientes sobre el filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales realizados por el Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana del IIBCE.

Trabajo publicado	Bovio-Winkler et al. (2018)	Bovio-Winkler et al. (2021)	Bovio-Winkler et al. (2023)
Tipo de estudio	Análisis preliminar en reactores UASB a escala real (Uruguay)	Meta-análisis de datos de ARNr de 16S de 62 reactores anaerobios de diferentes países	Metagenómica centrada en genomas en 3 tipos de reactores (incluye Uruguay)
Objetivo principal	Detectar abundancia y diversidad del filo Chloroflexota en UASB	Caracterizar la ecología global del filo en reactores metanogénicos	Determinar el potencial funcional del filo Chloroflexota a nivel genómico
Metodología	qPCR, T-RFLP, secuenciación 16S rRNA, FISH	Análisis bioinformático de datos depositados en bases de datos públicas	Ensamble de genomas (MAGs), FISH, anotación funcional
Hallazgos clave	Alta abundancia de clase Anaerolineae; correlación con carga orgánica y tipo de biomasa	Identificación de géneros dominantes y posibles relaciones tróficas con arqueas metanogénicas	Presencia de rutas fermentativas, genes para adhesión, EPS, metabolismo de N; propuesta de nuevos géneros y especies (<i>Ca. Villigracilis nielsenii</i>)
Importancia operativa	Posible rol en formación de gránulos y problemas de sedimentación	Enlace con estabilidad de gránulos y arquitectura de biomasa	Relevancia para prevención de bulking, eficiencia de tratamiento y resiliencia ecológica

Hipótesis de trabajo

Según lo reportado hasta el momento se postula que los microorganismos del filo Chloroflexota tienen un rol fundamental en los sistemas de tratamiento de aguas residuales en dos aspectos: degradan la materia orgánica compleja debido a su capacidad hidrolítica y son fundamentales en la formación y mantenimiento de los flóculos debido a su morfología filamentosa. Por otro lado, se ha postulado que también son responsables de problemas de bulking filamentoso, pero no se conoce las causas que lo provocan.

Debido a que son ubicuos en todos los sistemas de tratamiento de aguas residuales que tienen la característica de tener una alta concentración de células, se ha propuesto que pueden degradar la materia orgánica proveniente de la propia biomasa. Entonces, si su rol es solamente degradar los compuestos de la degradación celular, su composición taxonómica no va a depender del tipo de agua residual tratada en el sistema. Sin embargo, si su rol es también degradar polímeros provenientes del agua residual, habrá una selección de diferentes grupos taxonómicos dentro del filo de acuerdo a la composición química de la materia orgánica de los efluentes tratados.

Con respecto a la conformación de los flóculos, se ha postulado que debido a que son filamentos, forman una red en la cual los otros microorganismos se adhieren y conforman flóculos compactos con buena capacidad de sedimentar. Esto ocurre cuando la abundancia de estos microorganismos no es excesiva y cuando se encuentran dentro de los flóculos. Sin embargo, debido a causas no conocidas, en algunas ocasiones se produce el sobrecrecimiento de estos microorganismos que produce que los flóculos se vuelvan más laxos y pierdan la buena capacidad de sedimentar. Pero, no se conoce cual es la abundancia relativa de estos microorganismos en sistemas con buena sedimentación y cual es la abundancia en sistemas con mala sedimentación.

La hipótesis de esta tesis es que los microorganismos del filo Chloroflexota juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica compleja presente en los sistemas de tratamiento de aguas residuales ya sea proveniente de la propia degradación de la biomasa como del agua residual tratada. Por lo tanto, diferentes composiciones químicas de efluentes tratados seleccionarán diferentes grupos taxonómicos de estos microorganismos.

La otra hipótesis es que existe una correlación entre la abundancia de estos microorganismos y la sedimentación de la biomasa, con un valor óptimo para mantener los flóculos compactos, cuando se sobrepasa ese valor ocurren problemas de bulking.

Objetivos

El objetivo principal es comprender el rol de las bacterias filamentosas del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados. En particular se propone determinar si hay un efecto del tipo de agua residual por industria sobre la composición taxonómica de estos microorganismos y si hay una relación entre la abundancia de estos microorganismos y los problemas de sedimentación.

Preguntas a responder

¿Cuál es la abundancia de bacterias del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de nuestro país?

¿Su abundancia depende del tipo de agua residual tratada?

¿Cuál es la diversidad del filo Chloroflexota en las plantas de tratamientos de aguas residuales que están operando en el país?

¿Difieren según el tipo de agua residual que tratan los sistemas?

¿Tienen morfología filamentosa?

¿Existe una relación entre la abundancia de estos microorganismos y la sedimentabilidad del lodo?

Objetivos Específicos

- a) Conocer la diversidad y composición taxonómica de microorganismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados alimentados con diferentes aguas residuales.
- b) Conocer el efecto de las características del agua residual a tratar sobre la composición taxonómica de estos microorganismos.
- c) Determinar si existe una correlación entre la abundancia de estos organismos y la capacidad de sedimentación de los lodos.
- d) Verificar si tienen morfología filamentosa y determinar su posición dentro de los flóculos.

Metodología / Estrategia de trabajo.

Estrategia de trabajo

Este estudio se enmarca dentro de una investigación orientada a conocer las bacterias filamentosas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados de nuestro país y los problemas que estos microorganismos provocan. Esta tesis se enfocó en el estudio del filo Chloroflexota ya que es un filo frecuentemente reportado como bacteria filamentosa que causa problemas de bulking filamentoso. El trabajo comprendió la utilización y manejo de metodologías de biología molecular para obtener un mayor conocimiento del filo Chloroflexota en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) operativas a escala real en territorio nacional.

Se utilizó el muestreo llevado a cabo en el proyecto ANII-FMV_1_2021_1_16605 en el cual se tomaron muestras de PTAR de lodos activados que operan en nuestro país. Se seleccionaron plantas de tratamiento de diferente tipo de aguas residuales y con y sin problemas de sedimentación.

Para responder las diferentes preguntas planteadas se utilizó la siguiente estrategia:

Se utilizó la técnica de PCR cuantitativo (qPCR) utilizando primers específicos para el gen del ARNr de 16S de microorganismos del filo Chloroflexota con esta metodología es posible obtener la abundancia de estos microorganismos en las muestras tomadas de las diferentes plantas de tratamiento.

Se analizó la composición de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr 16S con el fin de identificar y clasificar microorganismos presentes en las muestras y obtener una visión detallada de la diversidad en la comunidad microbiana.

Se hicieron análisis multivariados para determinar si existe una separación de las muestras de acuerdo a la composición del agua residual tratada en cada planta.

Se utilizó la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas específicas para el filo Chloroflexota.

Se compararon los datos obtenidos de abundancia de los microorganismos del filo Chloroflexota con los datos de sedimentación del lodo, de abundancia de filamentos mediante microscopía óptica y los problemas de sedimentabilidad reportados por el personal técnico de las diferentes empresas.

Materiales y Métodos

Muestreo de sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados

Las muestras fueron obtenidas en el marco del proyecto ANII-FMV_1_2021_1_16605 dirigido por la Dra. Angela Cabezas. Las mismas fueron almacenadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología (LabMAB) del Instituto Tecnológico Regional Centro Sur (ITRCS) de la Universidad Tecnológica (UTEC). Las muestras para extracción de ADN fueron almacenadas en freezer a -20 °C mientras que las muestras destinadas a FISH se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 4 % como se explicará más adelante.

De las plantas monitoreadas en el proyecto, se eligieron 11 sistemas de lodos activados de tratamiento de diferentes aguas residuales. Dichas plantas tratan aguas residuales vinculadas a la industria alimentaria, efluentes de origen doméstico y pluvial y a la industria de producción de celulosa, todas operativas en Uruguay. Las muestras fueron tanto obtenidas en las plantas de tratamiento que colaboraron con el proyecto, como también enviadas por algunas de ellas cuando esto era posible. Tomando muestras individuales.

Estas 11 PTAR están conformadas por:

1. Dos plantas de tratamiento de efluentes de la industria frigorífica cárnica vacuna.
2. Una planta de tratamiento de efluentes de la industria de elaboración de cebada malteada.
3. Una planta de tratamiento de efluentes de una industria de elaboración de mermeladas y dulces.
4. Una planta de tratamiento de la industria vitivinícola.
5. Cuatro plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas y pluviales
6. Dos plantas de tratamiento de dos industrias de producción de celulosa

Para las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) industriales se eligió la siguiente nomenclatura: si se encuentra más de una PTAR del mismo rubro se correlaciona con un número como es el caso por ejemplo de las plantas de tratamiento diseñadas para tratar efluentes de origen doméstico y pluvial, para esta investigación se analizaron cuatro plantas distintas, D1, D2, D3 y D4.

Estas plantas de tratamiento están ubicadas en diferentes localidades del Uruguay (figura 8).



Figura 8 – Mapa de Uruguay mostrando la ubicación de las plantas de tratamiento de aguas residuales monitoreadas en esta tesis.

Las empresas donde se operan las plantas de tratamiento participantes en el proyecto dieron su consentimiento institucional para la recolección de muestras con fines de investigación científica, los datos identificatorios de las empresas se deben mantener en confidencialidad.

Se tuvieron en cuenta aquellas industrias que manifestaron tener problemas de bulking, y la disponibilidad a colaborar en el proyecto con la obtención de las muestras.

Características del agua residual tratada en las diferentes plantas

Industria de faena de animales vacunos

En los establecimientos dedicados a la faena animal, los efluentes generados provienen principalmente de dos fuentes: la línea verde, asociada al manejo de animales vivos y al lavado de medias reses, y la línea roja, vinculada directamente al proceso del sacrificio o faena propiamente dicho. La primera presenta una carga significativa de celulosa, lignina, bacterias entéricas, heces y orina, mientras que la segunda contiene elevadas concentraciones de proteínas, lípidos, sangre y sólidos suspendidos. En conjunto, los efluentes de frigoríficos presentan una elevada DBO y DQO, con alta carga de nitrógeno y fósforo, y pH variable dependiendo del tipo de residuos vertidos (tabla 13) (Pereira et al., 2016).

Para este trabajo se analizaron dos PTAR para este tipo de industria (F1 y F2).

Tabla 13. Caracterización física y química de los residuos líquidos resultantes de la línea verde de sacrificio de ganado y línea roja de procesamiento de carne vacuna (generado por el lavado de las herramientas manuales y mecánicas utilizadas en el sacrificio de ganado, la limpieza y desinfección del matadero y el corral, el lavado del ganado, la limpieza y desinfección de los cortes de carne y cuero extraídos del animal).

Parámetros valorados	$\bar{x} \pm \sigma$
pH	$7,3 \pm 0,6$
$BOD_5^{20^\circ C}_T$	$2401 \pm 2751 \text{ mgO}_2/\text{L}$
$BOD_5^{20^\circ C}_S$	$1136 \pm 1011 \text{ mgO}_2/\text{L}$
$BOD_5^{20^\circ C}_P$	$1265 \pm 1744 \text{ mgO}_2/\text{L}$
TSS	$4195 \pm 5879 \text{ mg/L}$
$N-NH_4^+$	$410 \pm 232 \text{ mg/L}$
NH_4^+	$93 \pm 52 \text{ mg/L}$
N-O	$56 \pm 24 \text{ mg/L}$
TP	$28 \pm 17 \text{ mg/L}$
PO_4^{3-}	$13 \pm 5 \text{ mg/L}$

Fuente: (Pereira et al., 2016)

Industria de producción de malta para cerveza

El proceso de malteo implica la modificación de componentes estructurales del grano, como almidones y proteínas, a través de diversas etapas que requieren un consumo considerable de agua. Esto da lugar a la generación de efluentes con características variables, dependiendo del tipo de cereal y del producto final. Durante la producción del malteado de la cebada para la elaboración de malta, por ejemplo, se generan residuos líquidos ricos en compuestos orgánicos fácilmente biodegradables (azúcares, proteínas, dextrinas, taninos, etc.), así como una importante carga de sólidos en suspensión con valores promedios de 350 mg/L, pH ácidos a neutros entre 6 y 8, las aguas residuales procedentes de las malterías se caracterizan por concentración promedio altas de DQO total de 1.531 mg O₂/L, DBO₅ de 745 mg/L, y concentraciones promedio bajas de Nitrógeno total de 44 mg/L y alcalinidad de 289 mg CaCO₃/L (Montoya & Ospina, 2013).

Se analizó una PTAR para este tipo de industria (Ma).

Industria de producción de mermeladas y dulces

Los procesos de elaboración de mermeladas implican el uso de frutas, sacarosa, pectina y ácido cítrico. La composición del efluente generado en esta industria depende en gran medida del tipo de fruta utilizada, el grado de madurez y la formulación del producto. Generalmente, los residuos líquidos presentan altos niveles de azúcares, pectina, compuestos orgánicos solubles y restos de fruta, lo que puede favorecer la formación de capas mucilaginosas en los equipos de tratamiento y promover el desarrollo de bacterias fermentativas. El pH suele ser ácido y se observan cargas orgánicas elevadas (Alfonso & Vargas, 2018). Se analizó una PTAR para este tipo de industria (Me).

La planta analizada para esta industria en particular fue operada con un sistema Reactor Secuencial Batch (SBR), este sistema funciona por lotes de efluente tratado, realizando toda la operación de una planta de tratamiento de aguas residuales de lodos activados en un solo tanque que es aireador y sedimentador al mismo tiempo. Realiza el tratamiento del efluente en lotes de ciclos continuos. Este sistema combina las etapas de llenado, aireación, homogeneización, sedimentación y vaciado en un proceso continuo y secuencial.

Industria vitivinícola

El sector vitivinícola presenta una marcada estacionalidad, concentrando la mayor parte de su producción durante la vendimia (enero-marzo a nivel nacional). En este período, se generan grandes volúmenes de efluentes (hasta 4 m³/m³ de vino producido), ricos en compuestos orgánicos como azúcares, etanol, ácidos orgánicos, polifenoles y taninos. La DBO puede alcanzar niveles altos de 35.000 mg/L a 20.000 mg/L y los sólidos suspendidos totales son elevados y varían ampliamente. Asimismo, las aguas residuales de bodegas pueden presentar baja alcalinidad y pH ácido, lo que repercute en la composición microbiana del sistema de tratamiento, esto también está relacionado a las diferentes etapas del proceso como la molienda, que se realiza durante el período de cosecha, la vinificación, que ocurre al cabo de los treinta a cuarenta días posteriores a la molienda y el resto del año, que conllevan una actividad muy reducida que se desarrolla con personal mínimo, según el tipo de bodega (tabla 14, 15) (Ugarte et al., 2000). Se analizó una PTAR para este tipo de industria (V1).

Tabla 14. Efluentes de Lavado de lagares y equipos de molienda originados durante el proceso de Molienda. (Descarga Continua, Descarga Batch) Rauek, 1998. Fuente: Ugarte et al., 2000.

PARÁMETRO	UNIDAD	DESCARGA CONTÍNUA (10 muestras)			DESCARGA BATCH (4 muestras)		
		Mín.	Máx.	Promedio	Mín.	Máx.	Promedio
pH	—	4,3	6,1	5,3	4,3	6,2	5,5
Conductividad eléctrica	µmhos/cm	1110	2110	1670	1570	2900	2190
Sólidos sedimentables (10 min)	mL/L	0,1	50	12,0	23	100	70,0
Sólidos sedimentables (2 hs)	mL/L	0,4	49	10	20	100	60
Sólidos totales	mg/L	1570	20800	5600	3620	11050	7730
Sólidos suspendidos	mg/L	170	2160	700	270	2700	1850
Sólidos disueltos	mg/L	1400	18640	4900	2220	9630	5880
DBO	mg/L	100	3500	1600	360	35150	12150
DQO	mg/L	1700	45000	10330	6100	50000	18550
Nitrógeno amoniacal	mg N-NH ₃ /L	0,1	8	1	6	23	10

Tabla 15. Parámetros de calidad del agua en la etapa de vinificación: efluentes originados por el lavado de piletas y vasijas luego de la fermentación de mostos. Resto del Año: efluentes originados por el lavado y desinfección de piletas y lavado de filtros. Rauek, 1998. Fuente: Ugarte et al., 2000.

PARÁMETRO	UNIDAD	VINIFICACIÓN (10 muestras)			RESTO DEL AÑO (5 muestras)		
		Mín.	Máx.	Promedio	Mín.	Máx.	Promedio
pH	—	4,3	9,2	6	3,7	12	7,2
Conductividad eléctrica	µmhos/cm	1430	2140	1820	1400	7900	4140
Sólidos sedimentables (10 min)	mL/L	0,1	220	26	0,1	32	7,00
Sólidos sedimentables (2 hs)	mL/L	0,5	80	10	0,1	22	7
Sólidos totales	mg/L	1350	12150	3900	2100	9100	4200
Sólidos suspendidos	mg/L	580	10300	2200	280	570	390
Sólidos disueltos	mg/L	1220	6350	2870	1820	8530	3810
DBO	mg/L	815	21450	5400	90	350	190
DQO	mg/L	1300	55000	9170	260	850	520
Nitrógeno amoniacal	mg N-NH ₃ /L	0,1	30	8	0,1	5	2

Plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas

Las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas procesan efluentes generados en los hogares, compuestos principalmente por aguas grises (lavado, cocina, baño) y aguas negras (provenientes de inodoros). Estos efluentes presentan una alta carga de materia orgánica biodegradable (restos de alimentos, grasas, excretas), nutrientes como nitrógeno y fósforo, detergentes, productos de higiene personal, microorganismos patógenos y, en menor medida, compuestos farmacéuticos y hormonas. El pH suele ser cercano a la neutralidad pH (rango en zonas industriales 6,32–8,15 y rango en zonas municipales 6,82–7,98), la DBO oscila en rango entre 144–403 mg/L en zonas industriales y 42,3–121 mg/L en zonas municipales, y se observa una alta diversidad microbiana de origen entérico (tabla 16) (Yang et al., 2020). Se analizaron cuatro PTAR para este tipo de PTAR (D1, D2, D3 y D4).

Tabla 16. Composición y concentración de aguas residuales crudas en plantas de tratamiento (PTARs). Donde Z es una planta de tratamiento de aguas municipales y D y P son plantas de tratamiento de aguas industriales. Unidad: mg/L, salvo que se indique lo contrario.

Contaminante	D-PTAR	Y-PTAR	Z-PTAR
DQO _{Cr}	185,17	221,00	234,00
DBO ₅	47,87	49,64	41,80
NH ₄ -N	13,87	26,28	36,60
NT	19,20	39,81	45,60
PT	2,40	3,95	4,36
Sólidos suspendidos	45,67	88,17	63,00
Sólidos disueltos totales	2578,33	3748,33	770,00
Sulfuro	3,322	0,922	8,860

Fuente: Activated Sludge Microbial Community and Treatment Performance of Wastewater Treatment Plants in Industrial and Municipal Zones (Yang et al., 2020).

Industria de producción de celulosa

La industria de producción de celulosa y papel genera grandes volúmenes de efluentes con una compleja matriz química. Estos efluentes provienen principalmente del proceso de cocción de la madera, el blanqueo de la pulpa y el lavado de equipos. Contienen altas concentraciones de materia orgánica disuelta y coloidal (lignina, hemicelulosas, resinas), sólidos en suspensión, compuestos clorados (en el caso de procesos con cloro), ácidos orgánicos, taninos y compuestos fenólicos.

El pH puede variar entre 4 y 9 dependiendo de la etapa del proceso. La DBO y DQO suelen ser elevadas, y los microorganismos presentes deben adaptarse a ambientes con compuestos tóxicos y baja biodegradabilidad (Wertz et al., 2010).

Se analizaron dos PTAR para este tipo de industria (Ce1 y Ce2).

En la tabla 17, se presenta la información recopilada en el proyecto FMV_1_2021_1_166805 y en la Tesis de Maestría de la Ing. Mariana Perroud sobre las PTARs analizadas. Se puede observar que una gran mayoría de las PTARs presentaba problemas de sedimentación según lo reportado por el personal técnico de las PTARs. Los datos de sedimentabilidad determinados en el proyecto y en la Tesis de Maestría de la Ing. Mariana Perroud muestran valores muy bajos de sedimentación, la observación microscópica muestra problemas en la conformación de los flóculos.

Tabla 17. Datos de las PTAR analizadas en este trabajo según la información recopilada en el proyecto FMV_1_2021_1_166805 y en la Tesis de Maestría de la Ing. Mariana Perroud. Los datos de sedimentabilidad de lodos fueron determinados como el volumen de lodo que sedimenta luego de 30 minutos en un cono Imhoff de 1.000 mL (cuanto más alto el valor peor es la sedimentación). Se incluyó datos de la observación microscópica realizadas en microscopio óptico con aumentos de 10X 40X y 100X. Tanto los análisis de sedimentabilidad y de microscopía óptica fueron realizados en el marco del proyecto FMV_1_2021_1_166805 y la tesis de Mariana Perroud, la gran mayoría con problema de sedimentabilidad y muestreadas días al azar.

Tipo de planta/ industria	Cód. de la planta de tratamiento	Tipo de planta	Observación	Reporta problemas de sedimentación	Sedimentabilidad (mL lodo sedimentado/L de muestra)	Estructura de los flóculos según el análisis de microscopía óptica
Celulosa	Ce1	Lodos activados, aireación extendida, dos piletas en paralelo	Deficiente en Nitrógeno se le agrega Urea	No	N.D.	flóculos bien formados, compactos y presencia de filamentosas de distinta morfología.
Celulosa	Ce2	Lodos activados, aireación extendida, dos piletas en paralelo	Deficiente en Nitrógeno se le agrega Urea	No	N.D.	flóculos bien formados, compactos y presencia de filamentosas de distinta morfología.
Frigorífico	F1	Lodos activados convencional, dos piletas en paralelo		Si	950	flóculos compactos, presencia de filamentos fuera de los flóculos
Frigorífico	F2	Lodos activados convencional, dos piletas en paralelo	Planta nueva	Si	400	flóculos compactos, presencia de filamentos fuera de los flóculos
Maltería para cerveza	Ma	Lodos activados convencional precedido de un biofiltro.		Si	900	flóculos poco compactos
Mermelada	Me	Reactor batch secuencial, aireación intermitente, dos piletas en paralelo	Producción zafral con cambio de materia prima	Si	675	flóculos poco compactos con abundancia de filamentos
Vitivinícola	V1	Sistema de lodos activados con aireador Venturini, seguido de una laguna facultativa, humedales y filtro de arena.	Producción zafral, problemas con la aireación.	Si	1000	flóculos abiertos, muchos filamentos
Tratamiento de efluentes domésticos	D1	Lodos activados, aireación convencional, desinfección por cloro	Problemas durante la temporada de verano	Si	900	flóculos abiertos y poco compactos
Tratamiento de efluentes domésticos	D2	Lodos activados, aireación convencional, desinfección por cloro	Problemas durante la temporada de verano	Si	950	flóculos abiertos y poco compactos

Tipo de planta/ industria	Cód. de la planta de tratamiento	Tipo de planta	Observación	Reporta problemas de sedimentación	Sedimentabilidad (mL lodo sedimentado/L de muestra)	Estructura de los flóculos según el análisis de microscopía óptica
Tratamiento de efluentes domésticos	D3	Filtro biológico (solo temporada alta), Lodos activados, aireación convencional, desinfección por cloro	Problemas durante la temporada de verano	Si	525	flóculos poco compactos
Tratamiento de efluentes domésticos	D4	Lodos activados, aireación extendida, remoción de nitrato y de P, desinfección por UV	Planta nueva	No	N.D.	N.D.

N.D.: no determinado

Valor óptimo de sedimentabilidad 100 mL lodo sedimentado/L de muestra

Procesamiento de las muestras

Las muestras de biomasa destinadas al análisis de FISH se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % y se almacenaron en freezer a -20 °C. Las muestras de biomasa destinadas a análisis basados en el ADN (qPCR y secuenciación masiva), se centrifugaron a 5.000 rpm y el pellet se almacenó en freezer a -20 °C. Las muestras fueron transportadas en frío al Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) del IIBCE (Montevideo) para ser analizadas (tabla 18).

Tabla 18. Nomenclatura y cantidad de muestras analizadas por las distintas técnicas de biología molecular (muestras independientes).

Planta/Industria	Código PTAR	FISH	qPCR	Sec. Masiva
Celulosa	Ce1	2	3	3
	Ce2	2	4	4
Frigorífico	F1	2	5	8
	F2	2	8	8
Maltería	Ma	1	3	4
Mermelada	Me	2	9	10
Vitivinícola	V1	2	12	12
Domésticos	D1	2	1	5
	D2	1	1	2
	D3	1	1	2
	D4	-	1	-

Extracción de ADN

Las muestras fueron descongeladas y posteriormente se extrajo el ADN a partir de 250 mg de biomasa húmeda, utilizando el kit Quick DNA fecal/soil Microbe Miniprep Kit de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración de ADN se determinó utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Nanodrop 1000 Spectrophotometer) y el programa Laptop Running ND1000 Versión 3.8.1. En las muestras utilizadas para qPCR la concentración de ADN se determinó utilizando el fluorómetro Qubit (2.0 Fluorometer, Invitrogen) el cual proporciona un intervalo de detección lineal de 0,2 a 100 ng y es altamente preciso para la detección del ADN bicatenario, incluso en presencia de ARN, esencial para la cuantificación precisa de ácidos nucleicos en aplicaciones como qPCR.

Cuantificación del número de copias de organismos del filo Chloroflexota mediante qPCR

La abundancia de microorganismos del filo Chloroflexota se cuantificó mediante qPCR utilizando primers específicos para este grupo dirigidos al gen ARNr 16S: 941F (AAACCACACGCTCCGCT) (Gich et al., 2001) y 1223R (CCATTGTAGCGTGTGTGTGTMG) (Björnsson et al., 2002). La metodología se basó en el protocolo descrito en el trabajo de Bovio-Winkler et al. (2018). Se utilizó el termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Sídney, Australia) con el kit de PCR SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemania), cada reacción se realizó con 15 µl de master mix con 5 µl de muestra de ADN o agua milliQ para las muestras blanco. El protocolo detallado se presenta en el Anexo.

Se utilizó como estándar para la curva de calibración un producto de PCR correspondiente al clon 58, obtenido a partir del análisis del gen ARNr 16S por clonación. Este clon proviene de una muestra de lodo de un reactor con alta presencia de bacterias del filo Chloroflexota (Etchebehere et al., 2002).

Para la curva de calibración se realizaron diluciones seriadas del producto de PCR del estándar de manera de tener diferentes diluciones de 1E+6, 1E+5, 1E+4, 1E+3, 1E+2 copias/ng ADN del gen del ARNr 16S para el filo Chloroflexota. La curva de calibración tuvo un R^2 entre 0,98872 y

0,99822. La eficiencia de la reacción de qPCR estuvo entre 99 % y 107 %. Para el análisis de las muestras se utilizó diluciones al décimo del ADN genómico extraído. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se utilizó un control negativo sin agregado de ADN. Los resultados se presentan como el promedio entre las réplicas junto con la desviación estándar.

Técnica de hibridación *in situ* fluorescente

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se llevó a cabo con el objetivo de determinar la morfología celular y la distribución espacial de las bacterias del filo Chloroflexota en los flóculos. El protocolo seguido fue adaptado de Bovio-Winkler et al. (2018) y se presenta en la sección de Anexo con mayor detalle. Brevemente, para la fijación de las células (para preservar la estructura celular) se utilizó paraformaldehído al 4 %, este proceso produce enlaces cruzados entre proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, por lo cual a partir de este punto la célula ya no es viable pero es estructuralmente integra para su posterior hibridación.

En la hibridación se incubaron las muestras con la sonda específica para las bacterias del filo Chloroflexota (CFX1223R: CCATTGTAGCGTGTGTGTMG y GNSB941: AAACCACACGCTCCGCT) marcadas con Cy3 (Björnsson et al. 2002; Gich et al. 2001) a 46 °C durante 90 min. Luego se procedió al lavado con buffer de lavado (la composición del buffer se presenta en la sección Anexos) más una tinción celular con 4',6'-diamin-2-fenilindol (DAPI).

Las muestras se observaron mediante microscopía confocal de barrido láser con el microscopio Zeiss modelo LSM 800; (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), disponible en el IIBCE. Las imágenes de los microorganismos se registraron con el programa “ZEN 2.6 system”. Se utilizaron los láser 20 Rhodamina (BP 540 nm – 552 nm) y 49 DAPI (BP 335 nm – 383 nm). Para el procesamiento de las imágenes se utilizó la versión Fiji Is Just del programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

Para poner a punto la técnica se utilizó un cultivo puro de *Sphaerobacter thermophilus* cepa DSMZ (DSM 20745) del filo Chloroflexota como control positivo.

Análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S

A partir del ADN extraído de las muestras, se realizó la secuenciación de productos de PCR del gen del ARNr de 16S utilizando la plataforma Illumina MiSeq en MacroGen Inc. (Seoul, Korea) con primers universales, dirigidos a la región V3-V4 del gen de ARNr 16S: Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC. Se solicitó una cobertura de al menos 100.000 secuencias paired-end (300 pb) por muestra. Una vez recibidos los resultados de la secuenciación se procedió a realizar el análisis bioinformático utilizando el programa “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” pipeline”, QIIME2 v2023.7 (Bolyen et al., 2019). Para su procesamiento se realizó la detección y eliminación de secuencias de baja calidad, quimeras y generación de Secuencias de Amplificación Variadas (por las siglas en inglés de "Amplicon Variant Sequence", ASVs) con plugin DADA2 (Callahan et al., 2016).

La secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S generó un total de lecturas que, tras los procesos de control de calidad, adaptadores, eliminación de quimeras y eliminación de secuencias de baja calidad, resultaron en un rango entre 17.185 y 40.416 secuencias por muestra (media = 25.311 ± 6.000 lecturas) de alta calidad.

Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos MiDAS (Dueholm et al., 2024). Esta base de datos es específica para sistemas de tratamiento de aguas residuales e incluye secuencias completas del gen de ARNr 16S obtenidas de dichos sistemas.

Para la visualización de los resultados se obtuvieron gráficos de barplots y heatmaps representando las abundancias relativas de las comunidades a los diferentes niveles taxonómicos y se realizaron análisis multivariados. Para esto se utilizaron los paquetes en RStudio (R versión 4.2.1): phyloseq, ampvis2, qiime2R, vegan, dplyr, ggplot2, microbiome.

Resultados y discusión

Cuantificación del filo Chloroflexota por qPCR

Con el objetivo de cuantificar específicamente a los organismos del filo Chloroflexota se utilizó la técnica de qPCR con primers específicos para este grupo. La concentración de ADN determinada utilizando el equipo Qubit varió entre 7,19 ng/μL y 516 ng/μL.

En la figura 10 se observan las curvas del control positivo y de las muestras. Se realizaron curvas de Melting para determinar la especificidad de la reacción, se observó un único pico con una $T_m = 86.5$ lo que indica que se obtuvo el amplicón esperado. En el caso de las muestras, estas se encontraron dentro de los valores de la curva de calibración de E+06 y E+02 expresado como número de copia del gen del ARNr 16S para el filo Chloroflexota por ng de ADN total (copias del gen del ARNr 16S para el filo Chloroflexota /ng ADN).

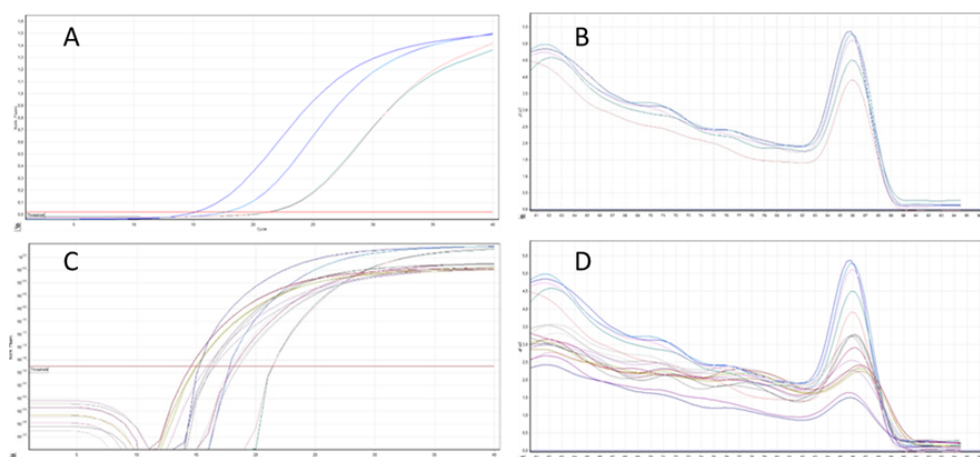


Figura 10. Curva de calibración qPCR para bacterias Chloroflexota (A), curva de Melting para las muestras de la curva de calibración (B), curvas de amplificación de los estándar y de las muestras (C), curva de Melting para las muestras y curvas de calibración (D).

Los resultados para cada análisis de qPCR se pueden ver en el Anexo.

Los resultados de la cuantificación muestran que los microorganismos del filo Chloroflexota se detectaron en todas las muestras analizadas. Los valores variaron entre 2,02E+02 copias/ng ADN

y 7,00E+04 copias/ng ADN. Siendo el valor más bajo el reactor de la industria frigorífica (F1-3) y el valor más alto para el reactor de la industria de celulosa (Ce2-2a) (tabla en Anexo).

En el reactor de la industria vitivinícola de la cual se obtuvieron más muestras en el tiempo, se observó valores entre 7,14E+02 copias/ng ADN y 8,39E+03 copias/ng ADN (tabla en Anexo). Los datos promedio se pueden ver en el siguiente resumen (tabla 19).

Tabla 19. Resumen de los datos obtenidos de la cuantificación de los organismos del filo Chloroflexota por qPCR en las muestras tomadas de las diferentes plantas de tratamiento. Se muestra el promedio de las muestras analizadas y la desviación estándar entre los valores.

Tipo de planta/industria	Código de la planta de tratamiento	Cantidad de muestras	Número de copias/ng ADN (promedio) (std)	
Celulosa	Ce1	3	1,10E+04	6,14E+02
	Ce2	4	1,81E+04	8,77E+02
Frigorífico	F1	5	7,25E+03	9,38E+02
	F2	8	1,43E+04	1,19E+03
Mermelada	Me	9	4,49E+03	4,85E+02
Vitivinícola	V1	11	4,38E+03	4,98E+02
Maltería para cerveza	Ma			3,21E+03
		3	2,82E+04	
Domésticos	D1	1	2,93E+04	3,34E+03
	D2	1	2,96E+04	1,59E+03
	D3	1	1,11E+03	1,87E+02
	D4	1	6,68E+02	6,44E+01

Análisis por industria

Cuando se analizó la abundancia del filo Chloroflexota de acuerdo al tipo de efluente tratado, los resultados muestran que las muestras tomadas de la planta de tratamiento de efluente de las industrias de celulosa (Ce2-1a; Ce2-1b; Ce-2a; Ce2-2b) mostraron una gran variabilidad en el tiempo, con un valor más alto (Ce2-2a) que el resto siendo de 7,00E+04 copias/ng ADN.

La abundancia del filo Chloroflexota en las muestras tomadas de los reactores de tratamiento de efluentes de las industria frigoríficas (F1 y F2) presentaron valores más homogéneos en

comparación con los obtenidos para las PTARs de las industrias de producción de celulosa (Ce1 y Ce2), aunque también se registró un valor relativamente alto de $2,67E+04$ copias/ng ADN.

La PTAR de la maltería (Ma) presentó valores entre $4,84E+04$ y $4,35E+03$ copias/ng ADN. Mientras que la PTAR de la industria vitivinícola, el cual tiene mayor número de muestras a lo largo del tiempo, mostró valores entre $5,51E+01$ y $8,39E+03$ copias/ng ADN, sin valores extremos tan marcados como los datos obtenidos en las PTAR de las industrias de celulosa (Ce2) o maltería (Ma) (figura 11).

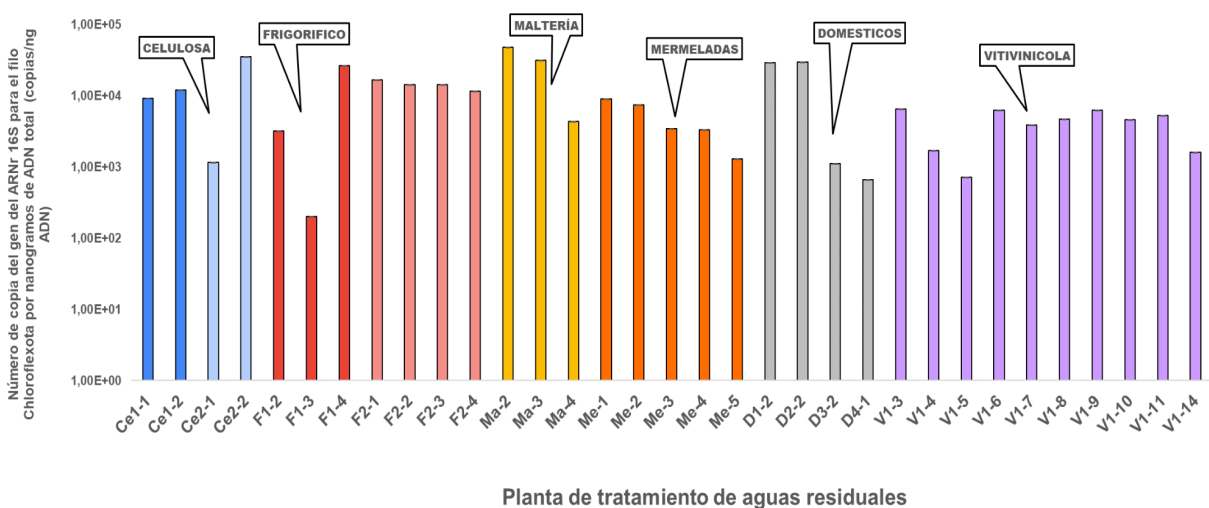


Figura 11. Cuantificación de bacterias del filo Chloroflexota mediante qPCR por industria y planta de tratamiento (separada por color), las muestras que fueron tomadas el mismo día de diferentes puntos de la planta de tratamiento de aguas residuales de lodos activados fueron promediadas.

Efecto del tipo de agua residual sobre la abundancia de organismos del filo Chloroflexota

Para conocer el efecto de las características del agua residual a tratar sobre la abundancia del filo Chloroflexota, se realizó un análisis de los datos obtenidos por qPCR agrupando las muestras en según el tipo de efluente a tratar, agrupando las muestras de las PTAR de las industrias de celulosa (Ce1 y Ce2), las de los frigoríficos (F1 y F2) y las de aguas residuales domésticas (D1, D2, D3, D4) (figura 12).

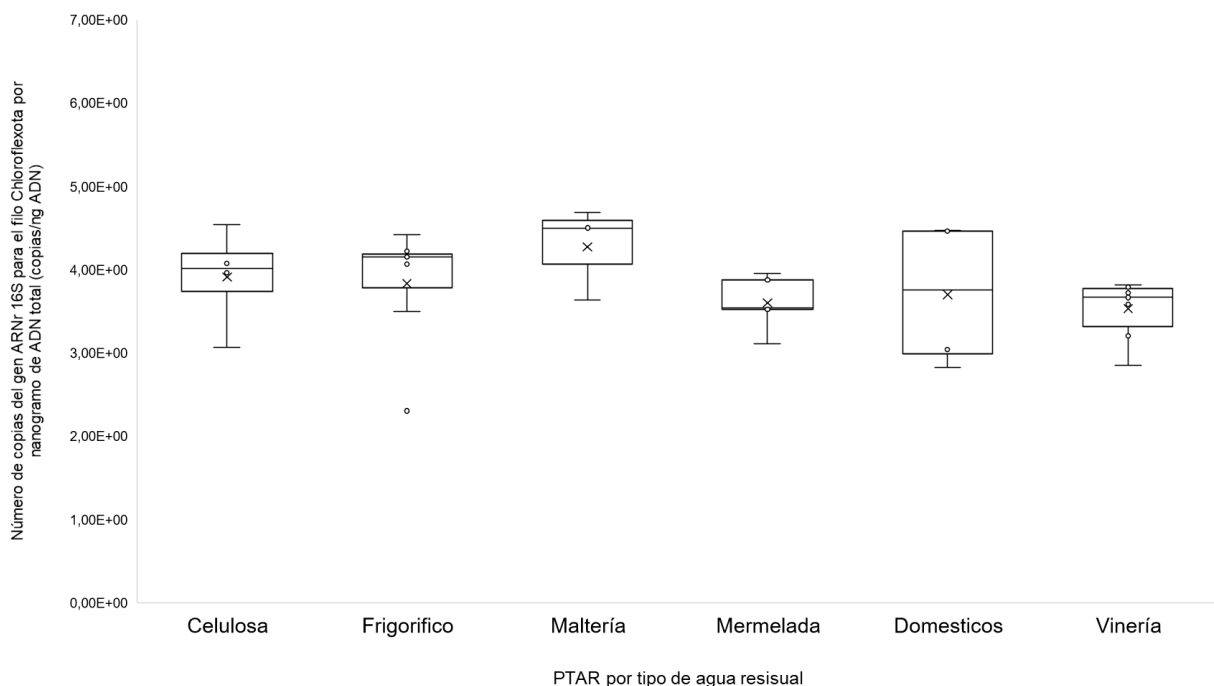


Figura 12. Gráficas de boxplot que muestran los resultados de cuantificación del filo Chloroflexota por qPCR agrupando las muestras por tipo de agua residual (en base logarítmica).

La gráfica de boxplot muestra que no existen grandes diferencias en la abundancia de los organismos del filo Chloroflexota según el tipo de agua residual a tratar, la mayor dispersión de valores se obtuvo para las PTARs de tratamiento de aguas residuales domésticas. Cabe aclarar que los valores obtenidos para las PTARs de las industrias de mermeladas, vinería y maltería son de una sola PTAR tomadas en diferentes días de muestreo.

Análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S

Comunidad microbiana total

Se analizó en primer lugar la comunidad total a nivel de filo y clase, para luego analizar en profundidad la comunidad dentro del filo Chloroflexota utilizando únicamente las secuencias clasificadas dentro de este grupo.

Los resultados del análisis de la comunidad microbiana caracterizada a nivel de filo mostraron que los filos más abundantes en todos los reactores fueron Proteobacteria, Chloroflexota Actinobacteriota, Patescibacteria, Planctomycetota (figura 13.a).

El filo Chloroflexota presentó una abundancia relativa que varió entre 1,8 % y 39,7 %. La PTAR de la industria vitivinícola presentó un valor promedio 8,7 % (std= 11,2 %), la de la industria de mermelada 17 % (std= 2,7 %), las PTARs de efluentes domésticos 21,5 % (std= 12,8 %), las de las industrias de celulosa 22,6 % (std= 6,7%), las PTARs de los frigoríficos 23,5 % (std= 9,1 %) y la PTAR de la maltería un valor promedio de 25,5 % (std= 6,7 %). Observándose los valores máximos puntuales en las muestras de las PTARs de las industrias, vitivinícola (39,7 %), maltería (34,1 %) y celulosa (31,2 %) y los valores más bajos en muestras de las PTAR de efluentes domésticos (5,4 %) y vitivinícola (1,8 %).

Se realizó gráfico de Ridge Plot para el análisis de la distribución de la abundancia relativa y analizar relaciones del efecto del tipo de agua residual, analizando las comunidades microbianas para los principales filos bacterianos presentes en las PTARs, resaltando en verde el filo Chloroflexota (figura 13.b). Las gráficas muestran que las muestras de las PTARs de las industrias frigorífica y de tratamiento de efluentes domiciliarios mostraron curvas de densidad más achatadas y extendidas, reflejando una mayor variabilidad entre las muestras y menor predominancia promedio para el filo Chloroflexota, mientras que las PTARs de la industria de mermelada y vinería tuvieron una abundancia relativa del filo Chloroflexota menos variable.

a)

10 most abundant Phylum		Celulosa				Domesticos				Frigorifico				Malteria				Mermelada				Vitivinicola																			
		Ce1-1-	Ce1-2a-	Ce2-1b-	Ce2-2a-	D1-1a-	D1-1c-	D1-2-	D2-1-	D2-2-	D3-1-	D3-2-	F1-1a-	F1-2a-	F1-3-	F1-4-	F2-1a-	F2-2a-	F2-3a-	F2-4a-	Ma-1-	Ma-2-	Ma-3-	Ma-4-	Me-1a-	Me-1b-	Me-2a-	Me-3a-	Me-4a-	Me-5a-	V1-10-	V1-11-	V1-14-	V1-2-	V1-3b-	V1-4-	V1-5-	V1-6-	V1-7-	V1-8-	V1-9-
Proteobacteria		41.6	43.8	51.1	36.1	41.8	32.4	23.2	22.3	10.9	38.4	51.6	34.1	26.5	15.7	8.9	31.8	37.3	31.4	42.9	38.4	33.7	37.9	45.7	55.4	53.3	52.6	50.8	51.5	51.5	82.4	79.6	76.1	41.7	44.7	79.2	83.1	85.4	84.6	82.5	82.1
Chloroflexi		16.6	24.3	18.5	31.2	19.3	11	28.8	34.5	38.9	5.4	12.5	33.2	16.3	38.8	28	20.5	22.6	12.9	15.8	27.3	34.1	20.6	19.8	22.1	15.9	17.7	14.5	15.5	16.3	4.4	5.9	6.3	18.3	39.7	2.5	1.8	2.8	4.4	4.7	5.4
Actinobacteriota		8.8	8.8	10.1	5.7	27	48.4	23	18.1	18.2	21.9	20.5	7.5	4.9	9.6	13.5	7.4	10.1	11	11.5	11.3	17.1	9.7	18.2	6.7	5.5	9.4	9	7.8	9.9	1.5	2.3	2.6	1.4	3.5	3.3	2.3	1.2	1.1	1.4	1.1
Patescibacteria		21.7	7.9	2.5	1.1	1.7	1.6	14.2	15.2	22.3	12.8	1.9	5.7	3.4	2.2	3.7	5	9.9	15.8	7.9	10.4	3.9	10	5.9	5.8	7.8	5.1	4.2	6	5.2	0.4	0.5	0.7	1.3	3.3	1.9	1.2	0.5	0.3	0.3	0.2
Planctomycetota		8	10.9	10.8	20.7	0.1	0	0.2	0.1	0.4	0.4	2.6	1.7	3	3.3	1.5	14.9	7.3	13.2	10.8	3.8	3.4	2.4	0.7	5.4	10	6.1	7.6	8.3	7	5	4.8	3	13.4	3.8	4.8	5.5	5.1	5.4	5.7	5
Firmicutes		0	0.4	0.1	0.2	8.7	6.1	8.7	5.9	5.9	13.8	7.5	2.7	1.5	3.3	8.4	4.5	1.2	2	1.1	2	2.7	3.5	2.7	0.6	0.3	3.7	8.1	1.4	0.5	3	3.7	8.9	17.9	4	7	4.1	3.5	2.3	2.6	2.6
Acidobacteriota		0.7	1.1	3	1.5	0.1	0.1	0.3	0.6	0.7	0.5	0.9	11.9	36.3	23.3	27.1	5.3	4.3	3.5	2.3	1.4	0.6	1.7	0.8	1.5	1.5	3.1	2.9	4.8	5.1	0.9	1	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9	0.6	0.6	0.7	1
Bdellovibrionota		0.5	0.8	0.2	0.1	0	0	0.3	0.5	0.4	0.2	0.3	0.1	0.6	0.1	1.2	0.6	0.2	0.2	2.6	0.6	0.3	2.1	1	0.5	1.8	0.3	0.2	1.3	0.7	1.7	1.1	0.4	2.6	0.1	0.3	0.2	0.5	1	1.5	2
Bacteroidota		0.7	0.4	2	1.9	0.3	0.2	0.2	0.6	0.8	1.3	1	0.6	0.9	0.8	0.5	0.5	1.3	0.4	0.7	0.7	1.4	0.7	1	0.6	1.2	0.5	0.7	1.4	1.4	0.4	0.6	0.8	1	0	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
Verrucomicrobiota		0.1	0.1	0	0.1	0	0	0	0	0.2	1.7	0.5	0	0.2	0.1	0.1	0.4	0.3	0.1	0.6	2.5	1.7	1.8	2.5	0.2	0.2	0	0.1	0.1	0.2	0	0	0	1.4	0.2	0	0.1	0	0	0	0
Remaining taxa (20)		1.3	1.6	1.7	1.3	1	0.3	1.1	2.2	1.3	3.5	0.8	2.3	6.4	2.7	7	9.1	5.4	9.7	3.9	1.7	1.1	9.6	1.7	1.2	2.7	1.4	1.8	2	2.1	0.3	0.6	0.9	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2

b)

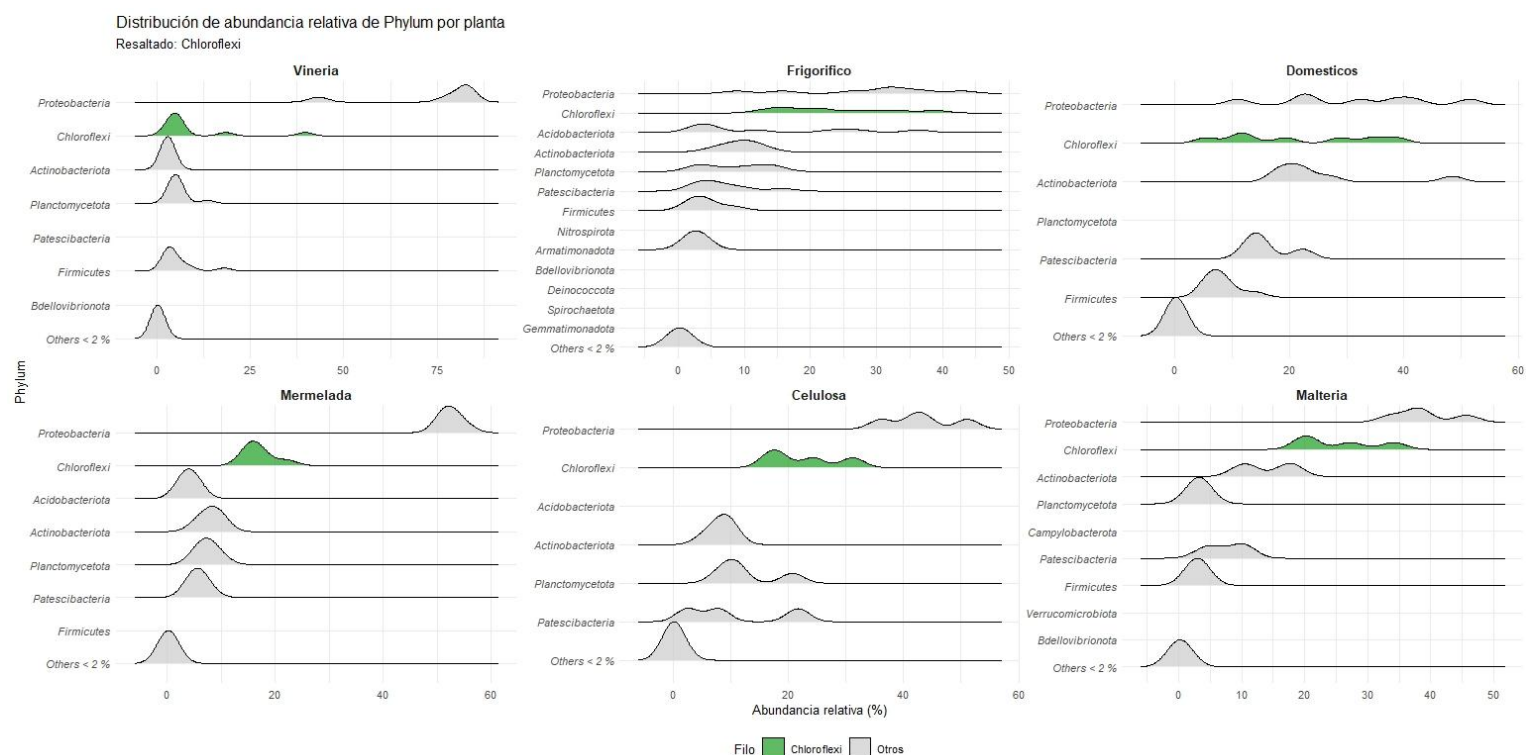
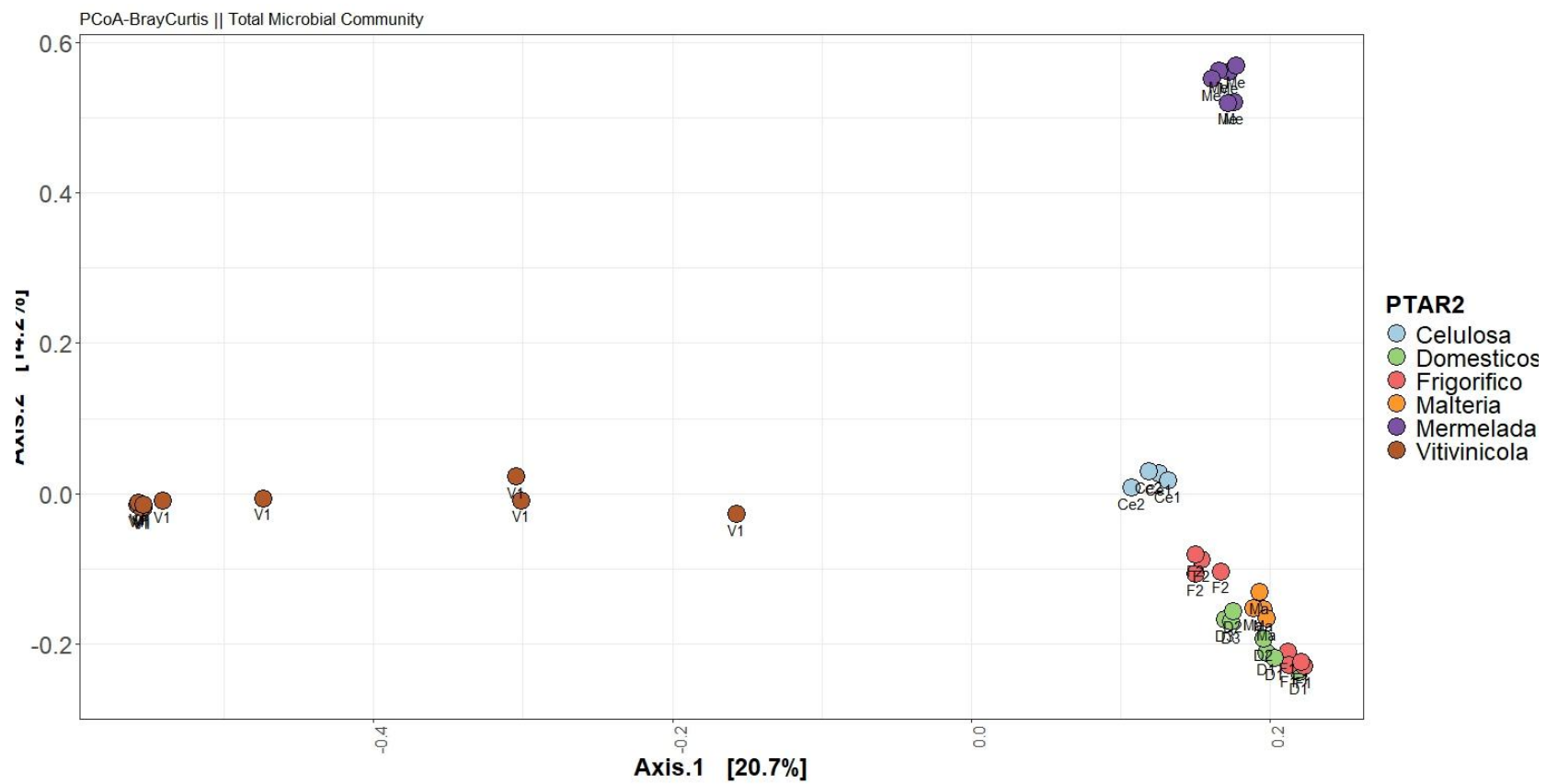


Figura 13. a) Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por filo de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul.

b) Gráfico Ridge Plot que muestra la variabilidad de la distribución de la abundancia relativa por filo de las muestras tomadas de las diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S para los ASVs clasificados para el filo Chloroflexota. Las muestras se agruparon por tipo de efluente a tratar.

Se realizó un análisis de PCoA (Análisis de Coordenadas Principales, índice de Bray-Curtis) utilizando la abundancia relativa de todas las ASVs clasificadas dentro del Dominio Bacteria, el resultado de este análisis mostró un agrupamiento de las muestras por planta de tratamiento y por tipo de agua residual tratada, el eje “y” (Axis2) representó el 14,2 % de la variación de los datos mientras que el eje “x” (Axis1) representó el 20,7 % de la variación (totalizando 34,9 % de la variación) (figura 14.a). Cuando se realizó este análisis con las ASVs clasificadas dentro del filo Chloroflexota se obtuvo un resultado similar. En este análisis, el eje “y” (Axis2) representó el 13,8 % de la variación de los datos, mientras que el eje “x” (Axis.1) representó el 18,5 % de la variación (totalizando 32,3 %) (figura 14.b).

a)



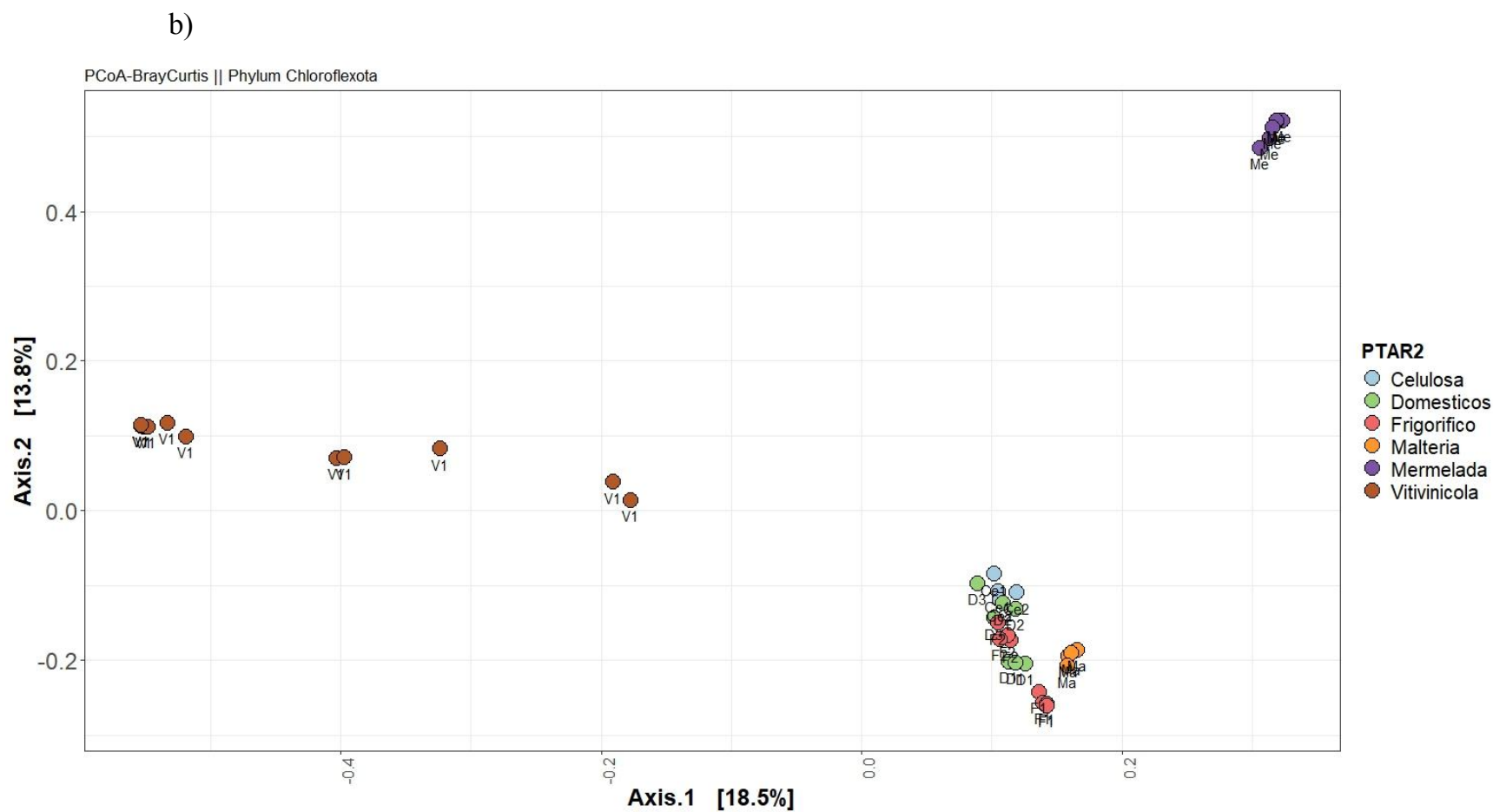


Figura 14. a) Análisis de Coordenadas Principales de Bray- Curtis (PCoA). Mostrando la distancia relativa de las muestras tomadas de las diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S.

b) Análisis de Coordenadas Principales de Bray- Curtis (PCoA). Mostrando la distancia relativa de las muestras tomadas de las diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S para los ASVs clasificados para el filo Chloroflexota.

Las muestras provenientes de la PTAR de la industria vitivinícola muestran un agrupamiento relativamente disperso, lo cual sugiere una variabilidad en las comunidades microbianas a lo largo del tiempo. Es importante destacar que esta PTAR fue sometida a monitoreo durante un período superior a un año, lo que permite inferir cambios temporales en su composición microbiológica.

Por otro lado, las muestras de la PTAR de la industria de mermeladas conforman un grupo compacto y claramente separado del resto, indicando una diferencia significativa en las comunidades microbianas en comparación con otras plantas de tratamiento analizadas.

Asimismo, las muestras de las PTARs de las industrias de celulosa, maltería, frigorífico y las de tratamiento de aguas residuales domésticas se agruparon en un mismo clúster, aunque se distinguen por planta. Este agrupamiento es particularmente cercano en el análisis de las comunidades del filo Chloroflexota, lo que sugiere que microorganismos similares constituyen estas comunidades en dichas instalaciones.

Comunidad microbiana dentro del filo Chloroflexota

Continuando con el análisis a nivel de clase, Anaerolineae fue la clase predominante dentro del filo Chloroflexota (figura 15), con una abundancia relativa que varió entre 47,5 % y 99,8 % (figura 16).



Figura 15. Boxplot de abundancia relativa para el filo Chloroflexota (color verde claro), se observa su presencia en todas las PTARs.

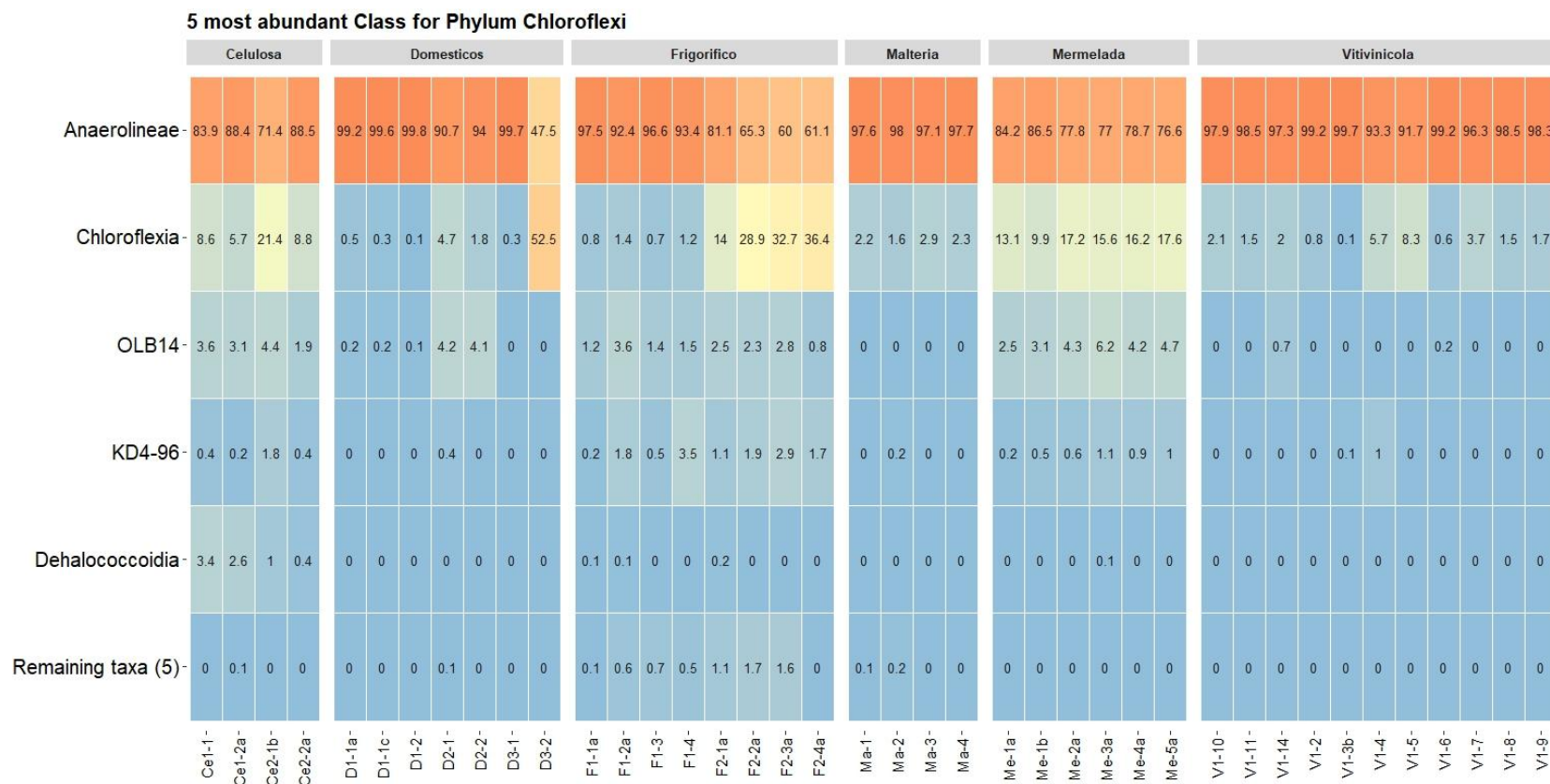


Figura 16. Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por clase dentro del filo Chloroflexota, de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul.

Cuando el análisis se hizo a nivel de orden, se observó que el orden Caldilineales predominó en la mayoría de las plantas de tratamiento (figura 17).

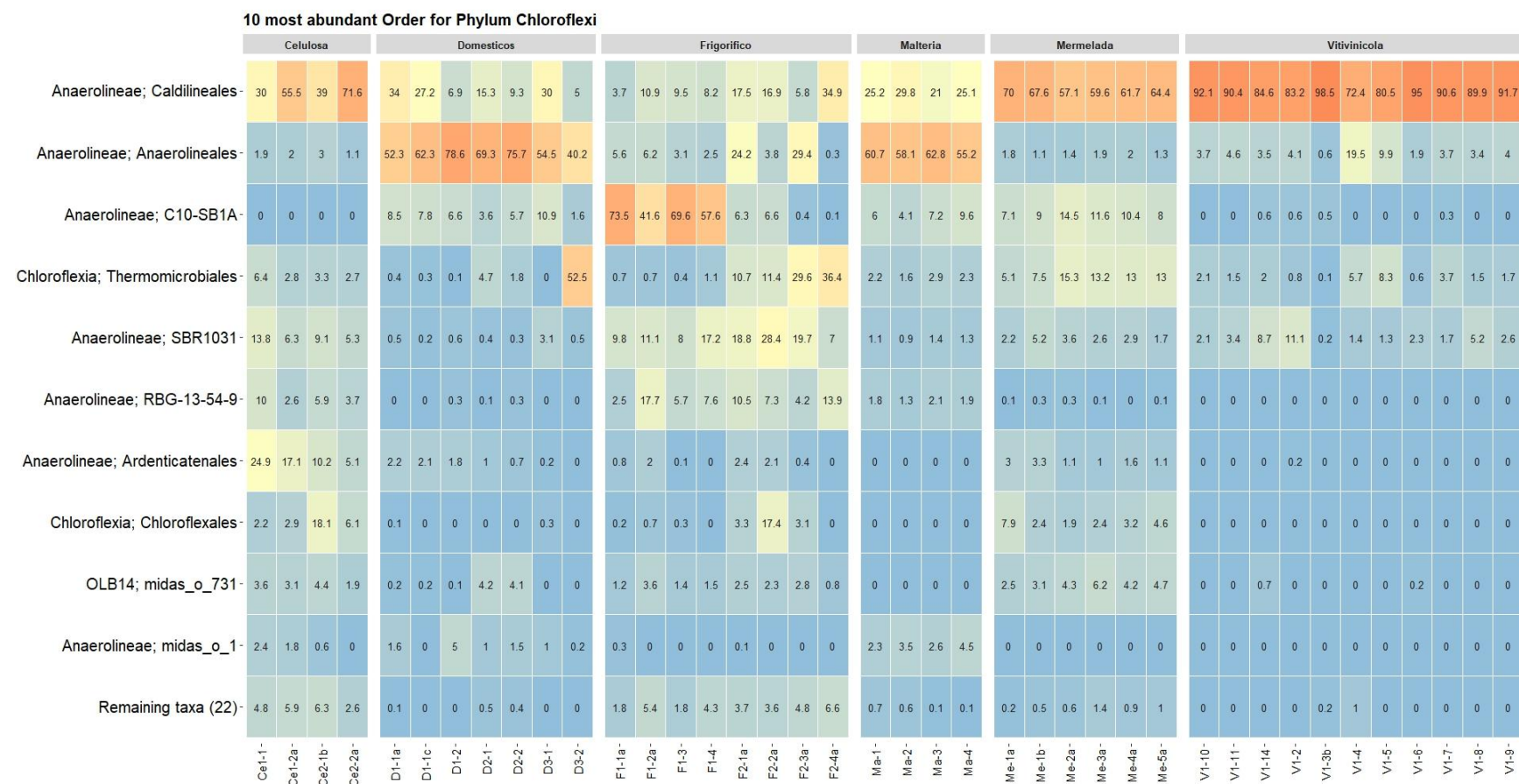


Figura 17. Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por orden dentro del filo Chloroflexota, de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul.

A nivel de familia las más predominantes fueron: Caldilineaceae para la mayoría de las plantas y Anaerolineaceae predominó en las plantas de tratamiento de aguas residuales de las industrias de Maltería, Mermeladas y de efluentes domésticos; excepto la familia Amarolineaceae que predominó en las plantas de tratamiento de agua residuales de la industria frigorífica (F1 y F2) (figura 18).

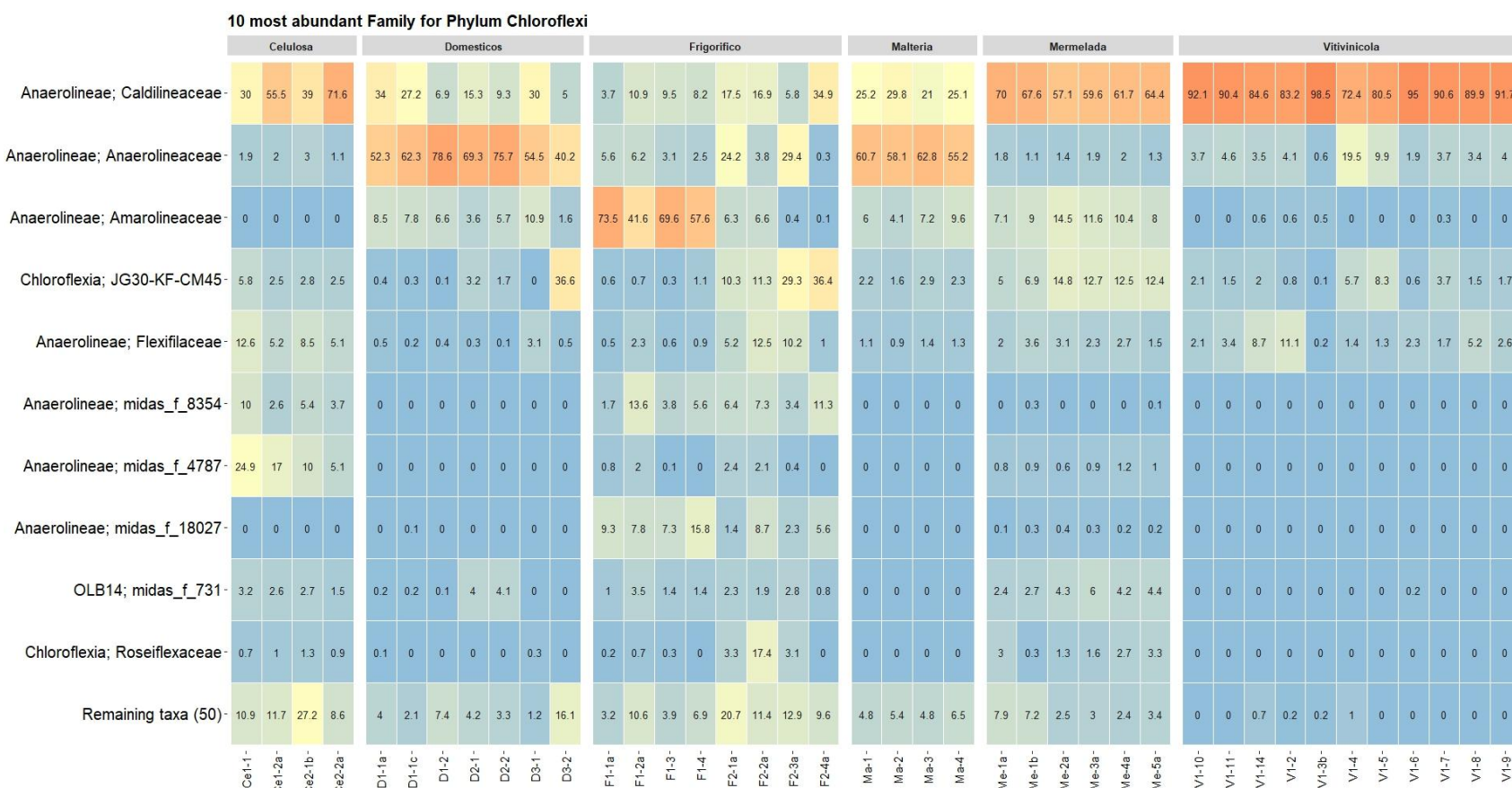


Figura 18. Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por familia dentro del filo Chloroflexota, de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul.

Los géneros predominantes variaron en las diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales y son específicos de cada planta, por ejemplo, en la PTAR de la industria vitivinícola el género predominante fue *midas_g_1668* que se mantuvo como el más abundante a lo largo del tiempo, mientras que en las otras plantas predominan otros géneros. Si bien hay algunos géneros que se comparten en más de una PTAR (figura 19 y 20).

Agrupando las muestras por tipo de agua residual tratada observamos que algunos géneros se comparten entre diferentes PTARs, mientras que otros solo se presentan en PTARs con un tipo de agua residual característica. Las PTARs de tratamiento de aguas residuales domésticas y la PTAR de la industria de maltería comparten los géneros *Leptolinea* y *Anaerolinea*, las PTARs de efluentes domésticos y de frigoríficos comparten el género *midas_g_859*, las PTARs de efluentes domésticos, frigorífico, maltería y mermelada comparten el género *midas_g_5463* (parte del género *Ca_Defluviifilum*), las PTARs de las industrias de mermelada y vitivinícola comparten el género *Ca_Defluviifilum* (tabla 20).

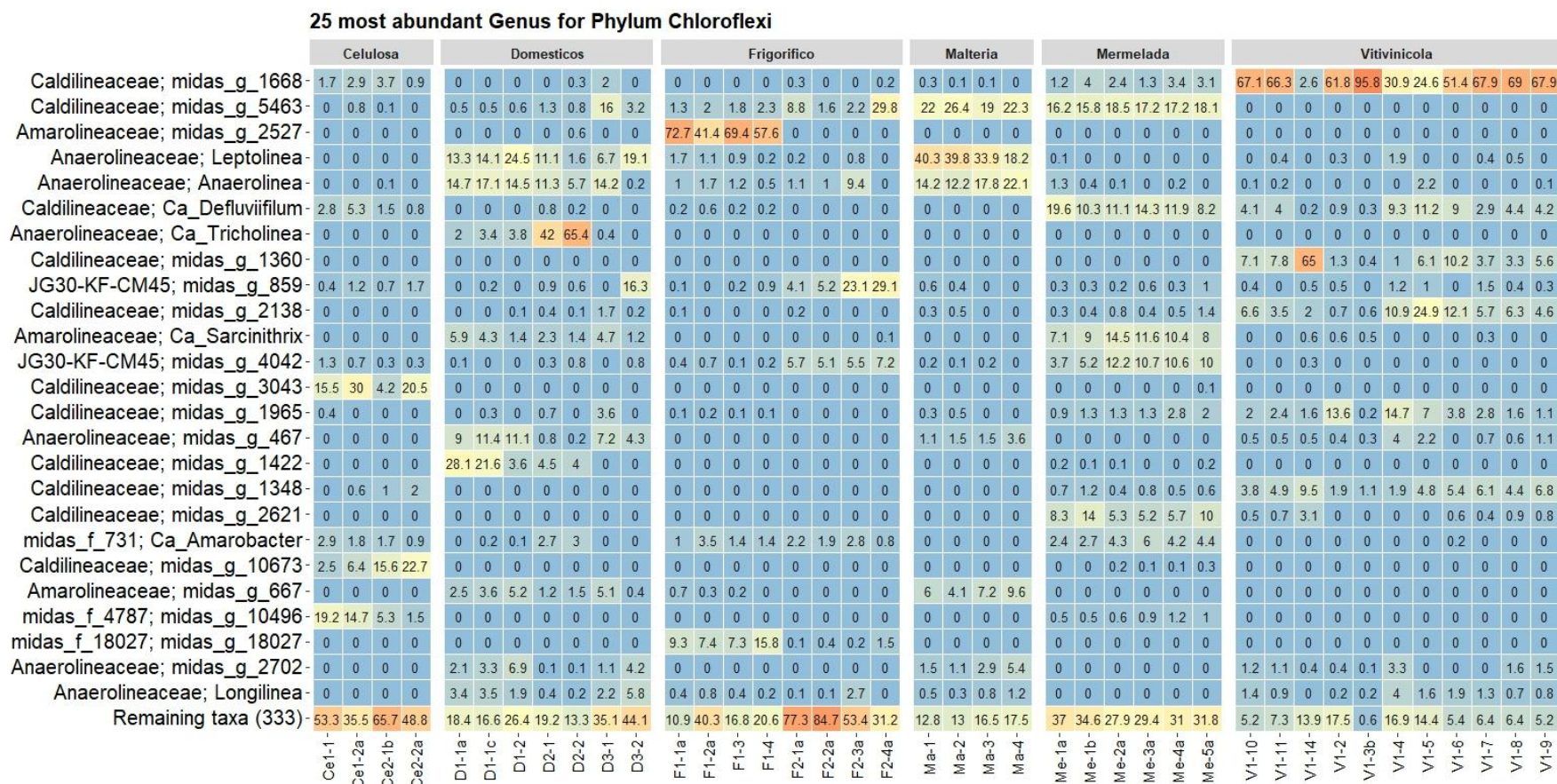


Figura 19. Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por familia dentro del filo Chloroflexota, de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul.

20 most abundant Genus for Phylum Chloroflexi- Celulosa

midas_g_3043; midas_s_9857-	15.5	30	4.2	20.5
midas_g_10496; midas_s_10496-	18.3	14	5.2	1.5
midas_g_10673; midas_s_10673-	2.4	3.7	11.7	9.9
f_Caldiineaceae_ASV5081; f_Caldiineaceae_ASV5081-	1.8	2	5.4	11.1
midas_g_10673; midas_s_18002-	0	2.7	3.4	12.7
midas_g_115685; midas_s_115685-	0.9	1.3	10.3	2.5
Ca_Defluviifilum; midas_s_4844-	2.8	5.2	1.5	0.8
midas_g_12378; midas_s_12378-	1.1	0.6	2.6	3.9
Ca_Pachofilum; g_Ca_Pachofilum_ASV4890-	0.9	2	3.2	1.3
midas_g_12378; g_midid_g_12378_ASV5077-	0.7	0.3	1.4	4.8
midas_g_20665; midas_s_31730-	4.3	0.1	1.3	1.3
f_JG30-KF-CM45_ASV4112; f_JG30-KF-CM45_ASV4112-	4.1	0.6	1.9	0.5
midas_g_28814; midas_s_28814-	3.4	1.5	0.9	0.9
Ca_Amarobacter; Ca_Amarobacter_glycogenicus-	2.6	1.4	1.3	0.9
midas_g_24368; midas_s_24368-	2.1	0.9	2	1
midas_g_13751; g_midid_g_13751_ASV5335-	2.8	1	1.6	0.6
midas_g_1668; midas_s_23350-	1	1.8	2.4	0.5
midas_g_11260; midas_s_11260-	0.7	0.2	1.9	2.4
midas_g_11376; midas_s_21287-	2.4	1.8	0.6	0
midas_g_33869; g_midid_g_33869_ASV5107-	2	2.4	0.5	0
Remaining taxa (151)-	30.2	26.2	36.4	22.8
	Cell-1-	Cell-2a-	Cell-1b-	Cell-2a-

20 most abundant Genus for Phylum Chloroflexi- Domesticos

Ca_Tricholinea; midas_s_9648-	2	3.3	3.8	42	65.4	0.4	0
midas_g_1422; midas_s_13680-	27.8	21.1	3.6	0	0	0	0
Anaerolinea; midas_s_17156-	5.2	5.2	7.9	6.3	0.3	0	0
midas_g_467; midas_s_1462-	4.5	6.3	8.7	0.4	0	5.1	0
Leptolinea; midas_s_14244-	3.9	5.8	12.2	0	0	0	0
Leptolinea; g_Leptolinea_ASV5485-	1.9	1.1	1.9	0.8	0	1.2	14.2
Anaerolinea; midas_s_24005-	5.2	6.9	1.3	1.6	4	0	0
midas_g_2702; midas_s_8654-	2.1	3.3	6.9	0	0	1.1	4.2
midas_g_882; midas_s_101259-	0	0	0	1.4	0.1	0	15.9
midas_g_156; g_midid_g_156_ASV5789-	1	2.1	6.6	0.4	0	1.3	4.8
Leptolinea; midas_s_11889-	3.3	2.8	5	0.1	0.1	3.3	0.7
Longilinea; g_Longilinea_ASV5613-	2.7	2.9	1.6	0.4	0.2	2.2	5.3
midas_g_467; g_midid_g_467_ASV5780-	3.6	5	0.8	0	0.2	1.1	4.2
Leptolinea; midas_s_16158-	1.9	2.2	2.1	6.8	0.4	0	0
midas_g_859; g_midid_g_859_ASV4134-	0	0	0	0	0	0	12.8
Ca_Sarcinithrix; midas_s_9994-	4.8	4	1.4	0	0.2	0	0
Ca_Sarcinithrix; g_Ca_Sarcinithrix_ASV5228-	1.1	0.2	0	2.3	0.7	4.7	1.2
midas_g_5463; g_midid_g_5463_ASV5018-	0	0	0	0	0	7.3	1.5
midas_g_5463; midas_s_58543-	0	0	0	0.3	0	8.5	0
midas_g_2582; midas_s_2582-	3.1	2.9	0	1	1.7	0	0
Remaining taxa (270)-	26	24.9	36.2	36.2	26.5	63.8	35.3
	D1-1a-	D1-1c-	D1-2-	D2-1-	D2-2-	D3-1-	D3-2-

20 most abundant Genus for Phylum Chloroflexi- Frigorifico

midas_g_2527; midas_s_10756-	72.6	40.6	69.1	57.6	0	0	0	0
midas_g_859; g__midas_g_859_ASV4144-	0	0	0	0	3.8	4.8	22.4	28.2
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV5018-	0.7	1	0.5	1.7	4.9	1.6	1.5	12
midas_g_18027; midas_s_19965-	1.1	1.9	4.8	8.9	0	0	0.2	0
Ca_Villigracilis; midas_s_14384-	0.2	0.3	0	0.4	4.7	0.5	9.3	0
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV5014-	0	0	0	0	1.3	0	0	13.9
midas_g_11938; midas_s_30061-	0.9	9.3	1.8	2.8	0	0	0	0
midas_g_26123; midas_s_28991-	0	0.6	0.2	0	2.5	10	0.6	0.4
midas_g_18027; midas_s_23544-	5.4	3.1	1.5	3.7	0	0	0	0
Ca_Amarolinea; midas_s_553-	0	0	0	0	6.3	6.6	0.4	0
midas_g_4042; midas_s_8697-	0	0	0	0	2.8	2.9	3.7	3.5
midas_g_8354; g__midas_g_8354_ASV6240-	0	0	0	0	4.2	5.3	1.9	1.6
midas_g_21647; midas_s_21647-	0	0	0	0	2.7	5.8	4.4	0
UTCFX1; midas_s_18999-	0	0	0	0	9.6	0.8	2.4	0
Ca_Amarobacter; Ca_Amarobacter_glycogenicus-	1	3.4	0.9	0.9	2.1	1.7	1.8	0.8
midas_g_27545; midas_s_30983-	0	0	0	0	0.4	1.7	9.3	0.6
midas_g_4374; midas_s_13455-	0	0	0	0	2.3	8.7	0.1	0.5
Anaerolinea; midas_s_23633-	0.3	0.2	0.7	0.5	1.1	1	7.7	0
Ca_Caldiilinea; Ca_Caldiilinea_saccharophila-	0.6	2.4	4.4	4.1	0	0	0	0
Kouleothrix; midas_s_3423-	0	0	0	0	0.8	9.8	0.8	0
Remaining taxa (296)-	17.2	37.4	16.2	19.4	50.5	38.8	33.5	38.5
	F1-1a-	F1-2a-	F1-3-	F1-4-	F2-1a-	F2-2a-	F2-3a-	F2-4a-

20 most abundant Genus for Phylum Chloroflexi- Malteria

Leptolinea; midas_s_118946-	34.9	34.9	9.1	5.3
Anaerolinea; midas_s_72306-	5.1	4.3	8.5	11.2
midas_g_5463; midas_s_7555-	5.9	7.7	4.6	3.4
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV5042-	4.7	5	4.2	5.7
Anaerolinea; midas_s_17156-	6.6	5.1	1.4	1.8
Leptolinea; g__Leptolinea_ASV5532-	0.7	1.5	7.3	3.6
midas_g_824; midas_s_824-	2.3	3.4	2.6	4.5
Leptolinea; midas_s_23502-	0.7	1.1	8.2	1.9
midas_g_2702; midas_s_8654-	1.3	1.1	2.9	5.3
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV5043-	1.9	2.4	1.8	3.2
midas_g_667; midas_s_22167-	1.9	2	2.2	3.3
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV4998-	2.1	2.3	2	1.8
midas_g_467; midas_s_1462-	1.1	1.5	1.5	3.5
midas_g_7812; midas_s_18798-	1.5	1.1	2.7	2.2
midas_g_5463; g__midas_g_5463_ASV5041-	1.3	1.8	2.1	1.8
midas_g_5463; midas_s_58543-	2.3	1.9	1.2	1.5
midas_g_1184; midas_s_1184-	1.5	1.4	2.2	0.7
f__Caldiilineaceae_ASV4976; f__Caldiilineaceae_ASV4976-	1.6	1.6	0.9	1.2
Anaerolinea; g__Anaerolinea_ASV5656-	0.4	0.6	1.1	2.7
midas_g_667; midas_s_51009-	1.3	0.7	1	1.6
Remaining taxa (160)-	21.2	18.7	32.5	33.7
	Ma-1-	Ma-2-	Ma-3-	Ma-4-

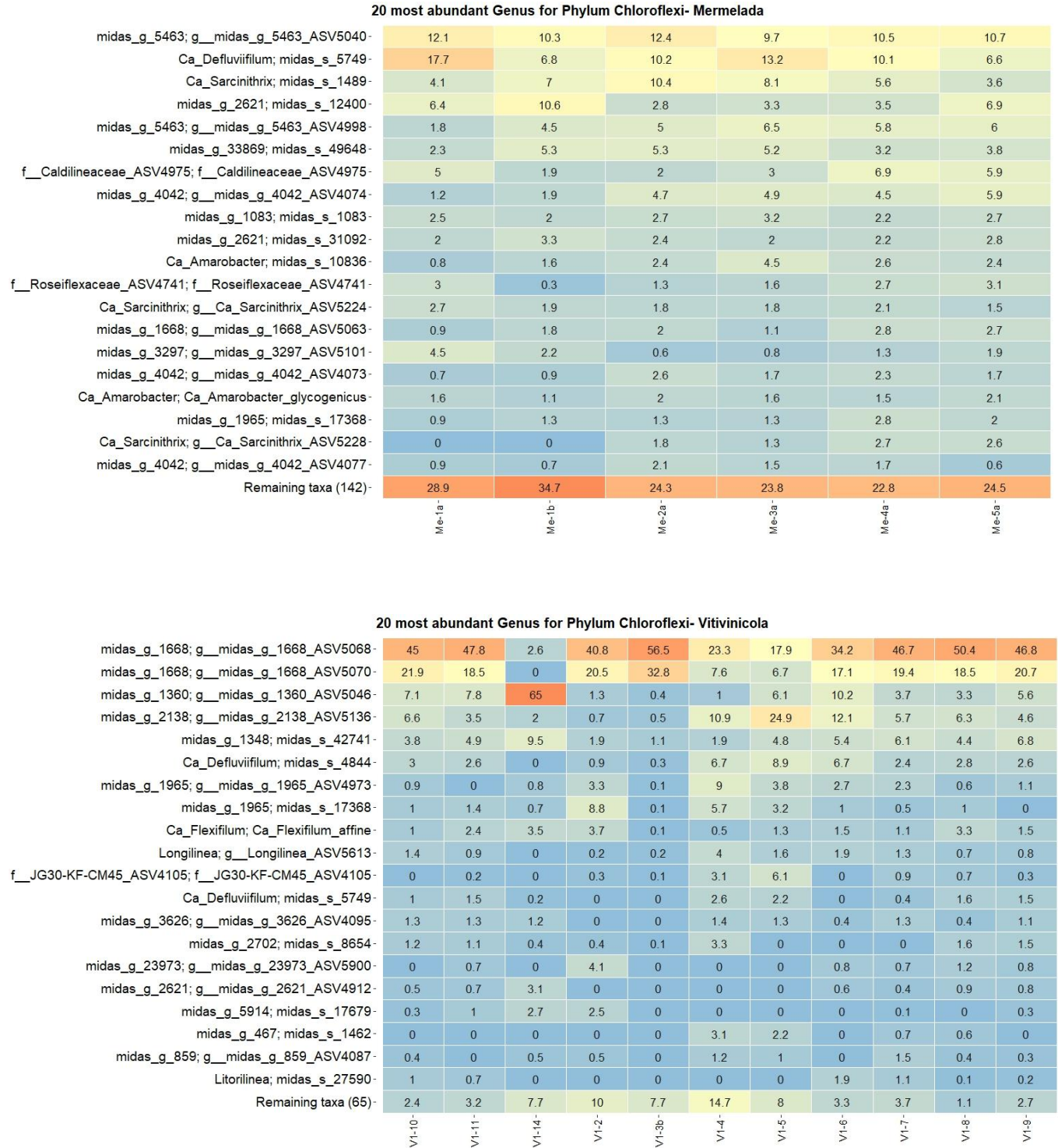


Figura 20. Gráfico de mapa de calor que muestra la abundancia relativa por género dentro del filo Chloroflexota, de acuerdo al análisis de las comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Se utilizó un código de color donde la mayor abundancia relativa se muestra en rojo y los de menores abundancia relativa en azul. Las muestras se agruparon por tipo de agua residual tratada:

De arriba a abajo por orden de aparición: Heatmap por industria a) Celulosa; b) Efluentes domesticos; c) Frigorífico; d) Maltería; e) Mermelada; f) Vitivinicola.

Tabla 20. Géneros presentes en las PTARs que tratan diferentes aguas residuales, se marcan en color los géneros que son compartidos con PTARs de tratamiento de diferentes aguas residuales.

Celulosa	Domésticos	Frigoríficos	Maltería	Mermelada	Vitivinicola
<i>midas_g_3043</i>	<i>Ca. Tricholinea</i>	<i>midas_g_2527</i>		<i>midas_g_2621</i>	<i>midas_g_1668</i>
<i>midas_g_10673</i>	<i>Leptolinea</i>		<i>Leptolinea</i>	<i>Ca. Defluviifilum</i>	<i>Ca. Defluviifilum</i>
<i>midas_g_10496</i>	<i>midas_g_859</i>	<i>midas_g_859</i>	<i>Anaerolinea</i>	<i>Ca. Sarcinithrix</i>	<i>midas_g_2138</i>
	<i>midas_g_882</i>			<i>midas_g_4042</i>	<i>midas_g_1360</i>
	<i>midas_g_5463</i>	<i>midas_g_5463</i>	<i>midas_g_5463</i>	<i>midas_g_5463</i>	
	<i>Anaerolinea</i>			<i>Ca. Amarobacter</i>	
3	6	3	3	6	4

Se observó también diferencias en las abundancias relativas a nivel de género en las diferentes PTARs. En las PTARs de las industrias de celulosa se observó mayor abundancia relativa en los géneros *midas_g_3043*, *midas_g_10673*, *midas_g_10496*. En las PTARs de efluentes domésticos se observó mayor abundancia relativa en los géneros: *Ca. Tricholinea*, *Leptolinea*, *midas_g_859*, *midas_g_882*, *midas_g_5463*, *Anaerolinea*. Mientras que en las PTARs de las industrias de frigoríficos se observó mayor abundancia relativa en los géneros: *midas_g_859*, *midas_g_5463*, *midas_g_2527*. En la PTAR de Maltería se observó mayor abundancia relativa en los géneros, *Leptolinea*, *Anaerolinea*, *midas_g_5463* y en la PTAR de la industria de mermeladas se observó mayor abundancia relativa en los géneros *midas_g_5463*, *Anaerolinea*, *Ca. Defluviifilum*, *Ca. Sarcinithrix*, *midas_g_4042*, *Ca. Amarobacter*. En la PTAR de la industria vitivinícola: se observó mayor abundancia relativa en los géneros: *Ca. Defluviifilum*, *midas_g_1668*, *midas_g_2138*, *g_1360*.

De los 18 géneros dentro del filo Chloroflexota con mayor abundancia en las PTARs analizadas solamente dos presentan microorganismos aislados (*Anaerolinea* y *Leptilinea*), cinco presentan genomas ensamblados y se han definido como “*Candidatus*” y 11 no tienen representantes cultivados ni genomas ensamblados, pero sí fueron detectados previamente en PTARs ya que se han clasificados según la base de datos de MiDAS, estos géneros se representan como g seguido de un número. Por lo tanto, la información sobre estos microorganismos en la bibliografía es escasa.

Observación de la morfología de las bacterias del filo Chloroflexota mediante FISH

En respuesta al objetivo específico d), que consiste en verificar la presencia de morfología filamentosa y determinar su localización dentro de los flóculos, se llevó a cabo un análisis de las muestras provenientes de las PTARs mediante la técnica de FISH, empleando sondas específicas para el filo Chloroflexota. Como control positivo, se utilizó un cultivo puro de *Sphaerobacter thermophilus*, el cual mostró hibridación positiva con la sonda, confirmando la correcta ejecución del procedimiento de hibridación (figura 21). Además, se analizó una muestra previamente estudiada de una PTAR, en la cual se había detectado la presencia de filamentos que hibridaban con la sonda, permitiendo verificar que el método funcionó adecuadamente en una matriz compleja (figura 21 y 22).

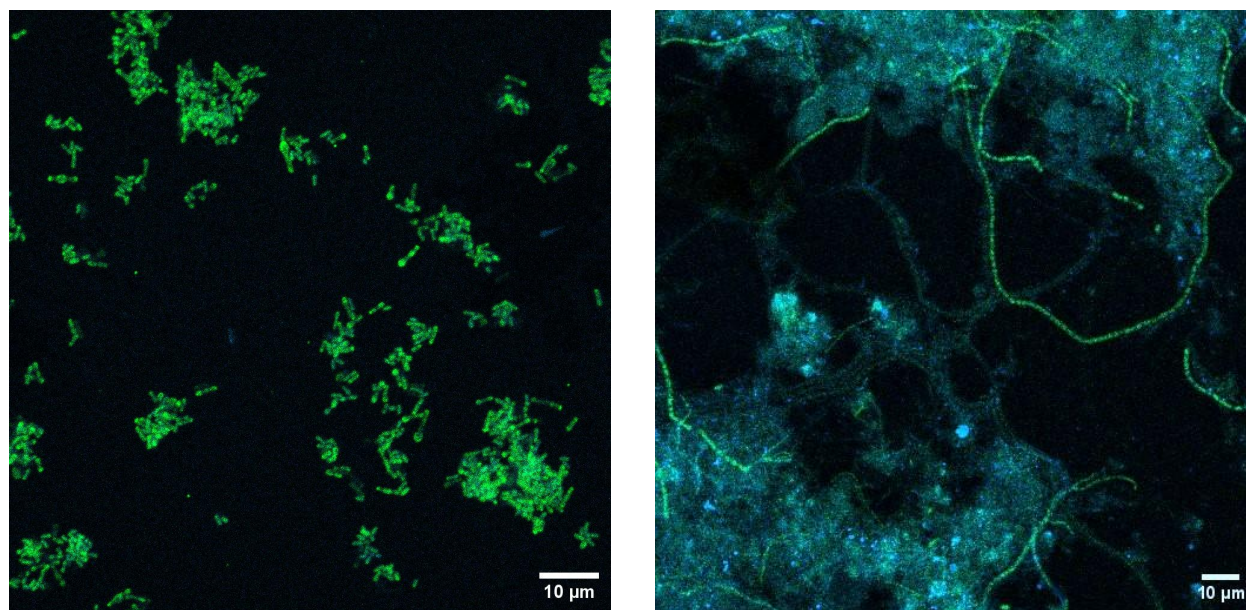


Figura 21. Micrografía tomada del cultivo puro de *Sphaerobacter thermophilus* (izquierda) y de una muestra compleja con presencia del filo Chloroflexota detectada previamente, obtenida de una PTAR de una industria vinculada a la maltería (derecha), microscopía de barrido láser confocal, imágenes producidas digitalmente con pseudocolores. La muestra se hibridó simultáneamente con sondas marcadas con Cy3 dirigidas al filo Chloroflexota GNSB941 y CFX1223R (verde), y tinción DAPI (azul), (barra, 10 µm).

Se analizó al menos una muestra por planta de tratamiento, en cinco de las PTARs analizadas se pudo detectar microorganismos que hibridaron con las sondas y que presentaron morfología filamentosa. Sin embargo, en las muestras de las plantas Ce2, F1, F2, D1 y D2 no se pudo

detectar filamentos que hibridaron con las sondas específicas aunque sí se detectó señal positiva de la sonda (tabla 21) (figura 23).

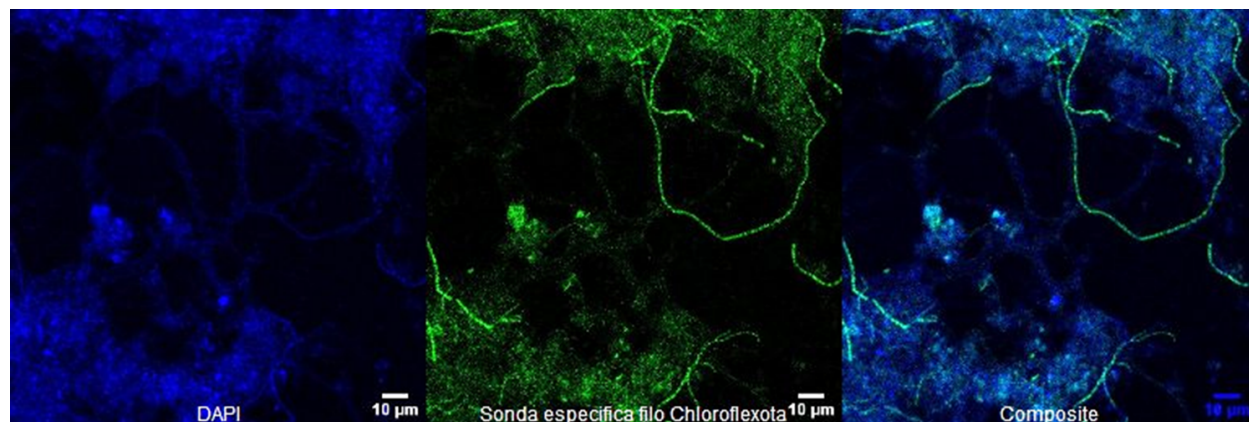


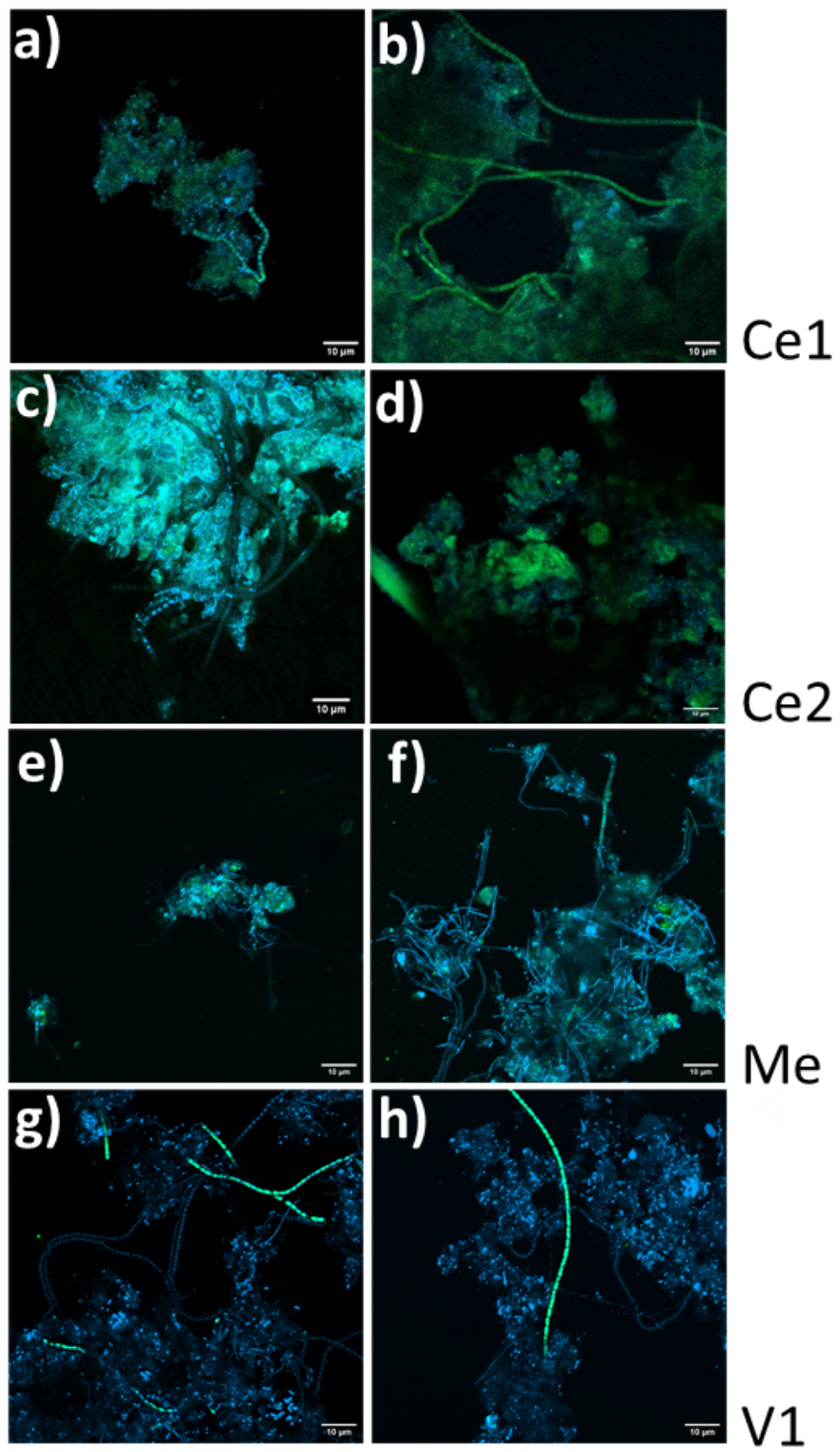
Figura 22. Micrografía de muestras tomadas de la planta de tratamiento de aguas residuales utilizada como control positivo (+). En las micrografías se observa en verde la señal (+) para bacterias del filo Chloroflexota, y en azul la tinción por DAPI. (barra, 10 µm).

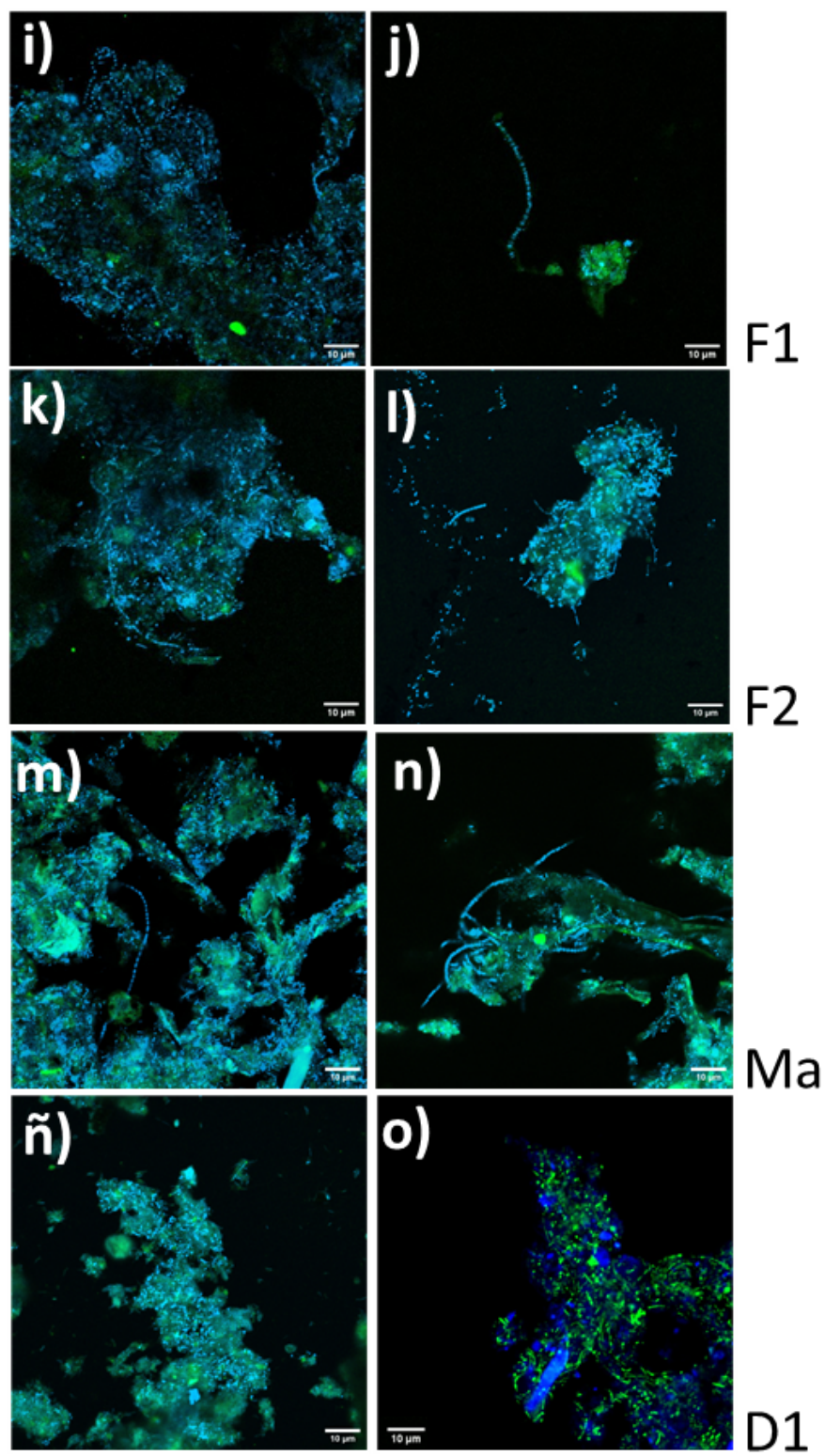
Tabla 21. Muestras en las cuales se realizó la técnica de FISH. En total se analizaron 22 muestras.

Número muestras analizadas por FISH	Código de la muestra	Detección de Filamentos	Detección de microorganismos no filamentosos
2	Ce1-1	+	-
2	Ce2-2a	-	+
1	F1-2a	-	+
1	F1-3	-	+
1	F2-1a	-	+
1	F2-1b	-	+
1	Ma-2	+	+
1	Me-1a	+	+
1	Me-2a	-	-
2	D1-2	-	+
1	D2-2	-	+
1	D3-2	+	-
1	V1-3a	+	-
1	V1-14	+	-
5	Control	+*	+**

* cultivo puro de *Sphaerobacter thermophilus*

** muestra compleja con bacteria filamentosa del filo Chloroflexota





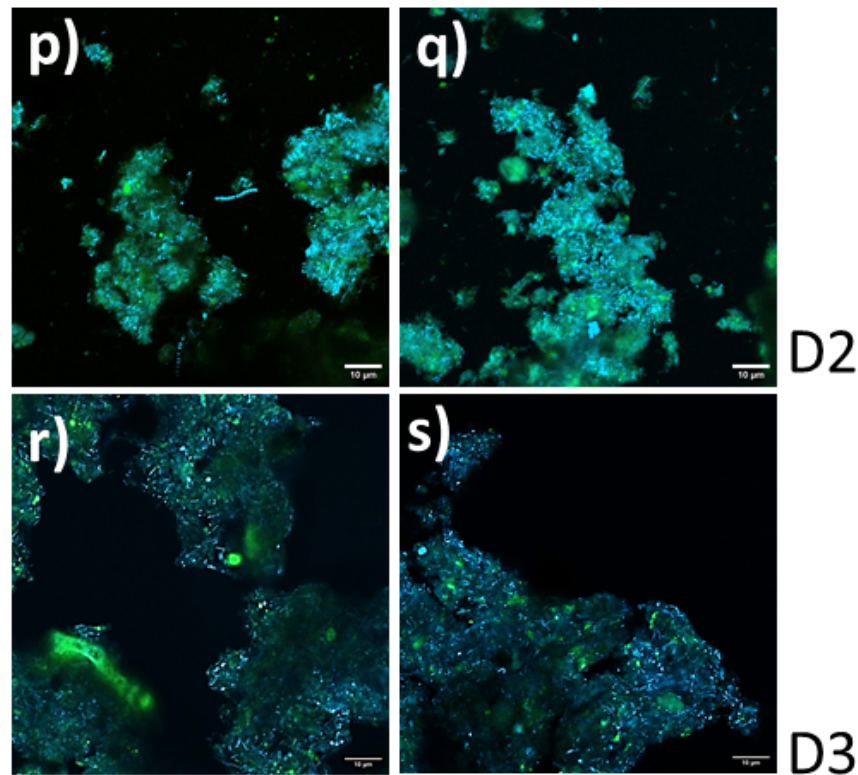


Figura 23. Micrografías tomadas de las muestras de las PTARs de Celulosa (a, b, c, d), Mermelada (e, f), Vitivinícola (g, h), Frigorífico (i, j, k, l), Maltería (m, n) y efluentes domiciliarios (ñ, o, p, q, r, s) mediante microscopía de barrido láser confocal (imágenes producidas digitalmente con pseudocolores). Las muestras se hibridaron simultáneamente con sondas marcadas con Cy3 dirigidas al filo Chloroflexota GNSB941 y CFX1223R (verde), y tinción DAPI (azul). Imagen compuesta, (barra, 10 µm)

Discusión

Los resultado obtenidos fueron resumidos en la tabla 22, la cual muestra los tipo de plantas analizados, reportes de problema de sedimentación, datos de sedimentabilidad obtenidos, estructura del flóculo, morfología filamentosa determinada por FISH con sondas específicas, géneros predominantes según los resultados de secuenciación masiva, valores promedios de abundancia relativa del filo Chloroflexota y los valores promedios de cuantificación mediante qPCR. A partir de los datos obtenidos, se procede a responder las preguntas planteadas para esta tesis de investigación.

Tabla 22. Resumen de los resultados del trabajo de tesis y los datos recopilados de las PTARs analizadas.

Tipo de planta	Código PTAR	Reporta problemas de sedimentación	Sedimentabilidad (mL/L)	Estructura de flóculos (MO)	FISH Filamentos	FISH - No filamentos	Género de Chloroflexota	A.R. filo Chloroflexota (%)	Resultado del qPCR Número de copias/ng ADN Promedio std	
Celulosa	Ce1	No	N.D.	flóculos bien formados, compactos y presencia de	Si	No		20.5	1,10E+04	6,14E+02
	Ce2	No	N.D.	filamentosas de distinta morfología.	No	Si	*g_3043; *g_10673; *g_10496	24.9	1,81E+04	8,77E+02
Frigorífico	F1	Si	950	flóculos compactos, presencia de	No	Si	g_2527	29.1	7,25E+03	9,38E+02
	F2	Si	400	filamentos fuera de los flóculos	No	Si	g_859; g_5463	18	1,43E+04	1,19E+03
Maltería para cerveza	Ma	Si	900	flóculos poco compactos	Si	Si	Leptolinea; g_5463; Anaerolinea	25.5	2,82E+04	3,21E+03
Mermelada	Me	Si	675	flóculos poco compactos con abundancia de filamentos	Si	Si	g_5463; Ca_Defluviifilum Ca_Sarcinithrix; g_4042	17	4,49E+03	4,85E+02

Tipo de planta	Código PTAR	Reporta problemas de sedimentación	Sedimentabilidad (mL/L)	Estructura de flóculos (MO)	FISH Filamentos	FISH - No filamentos	Género de Chloroflexota	A.R. filo Chloroflexota (%)	Resultado del qPCR Número de copias/ng ADN Promedio std	
Vitivinícola	V1	Si	1000	flóculos abiertos, muchos filamentos	Si	No	g_1668; g_2138; g_1360	8.7	4,38E+03	4,98E+02
PTAR de efluentes domésticos	D1	Si	900	flóculos abiertos y poco compactos	No	Si	*Ca_Tricholinea *Leptolinea; *Anaerolinea	19.7	2,93E+04	3,34E+03
	D2	Si	950	flóculos abiertos y poco compactos	No	Si		36.7	2,96E+04	1,59E+03
	D3	Si	525	flóculos poco compactos	Si	No	Ca_Tricholinea; Leptolinea; g_859; g_5463; Anaerolinea	9	1,11E+03	1,87E+02
	D4	No	N.D.	N.D.	N.D	N.D	N.D	N.D	6,68E+02	6,44E+01

*(ambas plantas comparten los mismos géneros), A.R. abundancia relativa del filo Chloroflexota en la comunidad total, N.D. no determinado.

¿Cuál es la abundancia de bacterias del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de nuestro país?

La cuantificación mediante qPCR utilizando cebadores específicos para el gen del ARNr 16S para el filo Chloroflexota, reveló su presencia en todas las plantas de tratamiento de aguas residuales evaluadas, confirmando su distribución en estos sistemas. Los valores de abundancia variaron entre 2,02E+02 y 7,00E+04 número de copias del gen ARNr 16S por ng de ADN total, siendo los niveles más bajos detectados en una muestra de una planta frigorífica (F1-3) y los más altos en una muestra de una planta de tratamiento de efluentes de celulosa (Ce2-2a).

Estas cifras se encuentran dentro de los rangos reportados por otros estudios que han identificado consistentemente al filo Chloroflexota como uno de los grupos bacterianos predominantes en sistemas de lodos activados (Yoon et al., 2010; Nittami et al., 2017).

En el trabajo de Nittami et al., 2019 analizaron 11 plantas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados municipales y mediante qPCR dirigido específicamente al gen del ARNr de 16S del género *Kuleothrix* (género clasificado dentro del filo Chloroflexota), las muestras presentaron valores entre E+04 y E+05 copias/ng ADN si bien en este trabajo se utilizó primers diferentes a los utilizados en esta tesis se podría considerar que están dentro de los valores detectados.

Por otro lado, en el trabajo de Bovio-Winkler et al., 2018, se utilizó la misma metodología utilizada en esta tesis para analizar muestras de reactores metanogénicos del tipo UASB con biomasa granular, en este trabajo se reportó valores entre E+07 y E+10 copias del gen del ARNr de 16S de Chloroflexota por ng de DNA, cinco órdenes superiores que los reportados en las plantas de lodos activados analizadas en esta tesis. Estos resultados indican que los organismos del filo Chloroflexota tienen una mayor abundancia en reactores metanogénicos granulares que en reactores de lodos activados.

El análisis por industria mostró que las PTAR con mayor abundancia relativa de bacterias del filo Chloroflexota corresponden a sistemas que tratan efluentes con alta complejidad en su composición química, como las industrias de celulosa, maltería y doméstica. Este hallazgo es

coherente con observaciones previas, que destacan la capacidad del filo para adaptarse a ambientes con matrices químicas complejas (Yamada & Sekiguchi, 2009).

En particular, los reactores de maltería y de tratamiento de efluente doméstico (Ma, D1 y D2) presentaron valores superiores a $2,8E+04$ copias/ng de ADN total, lo que indica una selección del filo Chloroflexota en estas condiciones.

¿Su abundancia depende del tipo de agua residual tratada?

Los resultados obtenidos mediante qPCR evidencian una asociación entre la composición del agua residual tratada por tipo de industria y la abundancia de bacterias del filo Chloroflexota. Las plantas de tratamiento que procesan efluentes con alta complejidad y variabilidad química como los provenientes de la industria de celulosa, los frigoríficos, la maltería y los efluentes domésticos presentaron mayores valores de número de copias del gen del ARNr 16S por ng de ADN total. Esto sugiere que la disponibilidad de diversos sustratos orgánicos, incluyendo lignina, proteínas, lípidos, hemicelulosa y compuestos fenólicos, favorece la proliferación de este grupo microbiano.

Desde un enfoque funcional, la elevada abundancia de bacterias del filo Chloroflexota en sistemas alimentados con efluentes complejos podría relacionarse con su rol clave en la etapa de hidrólisis de la materia orgánica, en particular en ambientes ricos en celulosa o proteínas (Petriglieri et al., 2023). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el tipo de sustrato disponible actúa como un factor determinante en la estructura y dinámica de las comunidades microbianas en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Yang et al., 2020).

¿Cuál es la diversidad del filo Chloroflexota en las plantas de tratamientos de aguas residuales que están operando en el país?

El análisis de diversidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen del ARNr 16S permitió caracterizar en profundidad la composición del filo Chloroflexota en las plantas de tratamiento estudiadas. A nivel de clase, Anaerolineae fue consistentemente la más abundante, con una abundancia relativa que osciló entre 47,5 % y 99,8 % (dentro del filo Chloroflexota) en

las distintas muestras, seguida por miembros de las clases Chloroflexia, Dehalococcoidia, OLB14 y KDA-96, aunque estas últimas en proporciones mucho menores.

Este predominio de la clase Anaerolineae es coherente con estudios previos que vinculan esta clase fuertemente a sistemas de tratamiento de aguas residuales, tanto aeróbicos como anaeróbicos (Yamada et al., 2007; Narihiro et al., 2015). Su abundancia sugiere una alta adaptabilidad ecológica, respaldada por su potencial para degradar polímeros complejos, como celulosa y proteínas, y por su capacidad para participar en asociaciones simbióticas con otros microorganismos (Petriglieri et al., 2023). En particular, se ha reportado que miembros de este grupo poseen genes para la utilización de oxígeno como aceptor terminal de electrones, lo que explicaría su presencia en sistemas aeróbicos a pesar de que muchos de los microorganismos aislados dentro de esta clase se reportan como anaerobios estrictos (Bovio-Winkler et al., 2023).

A niveles taxonómicos inferiores, se observó una marcada diversidad en las familias y géneros predominantes que variaron según el tipo de industria y la planta de tratamiento estudiada. Por ejemplo, Caldilineaceae fue dominante en las PTARs de las industrias de celulosa, mermelada y vitivinícola, mientras que Anaerolineaceae predominó en plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas y de la industria cervecera.

A nivel de género, se identificaron diferencias significativas entre los sistemas, destacándose géneros como *Ca_Defluviifilum*, *Anaerolinea*, *Leptolinea*, y los géneros identificados según MiDAS como *midas_g_5463*, *midas_g_859* y *midas_g_1668*. La gran mayoría de los géneros detectados no tienen representantes cultivados, lo que refleja el alto grado de desconocimiento sobre este grupo de microorganismos en estos sistemas.

No está muy claro aún por qué estos microorganismos son difíciles de obtener en cultivo puro. Una posible explicación es que se caracterizan por su lenta tasa de crecimiento. Todos los aislamientos de la clase Anaerolineae que se han obtenido fueron obtenidos a partir de muestras provenientes de reactores anaerobios y presentan tasas de duplicación que van de cinco horas a los 19 días. Considerando además, que tienen un metabolismo fermentador de compuestos orgánicos complejos y simples, existe una gran competencia con fermentadores de rápido crecimiento por estos sustratos (Sekiguchi et al. 2001). Esto dificulta el enriquecimiento de estos organismos y por lo tanto su posterior aislamiento.

En ambientes como los sedimentos marinos, se ha planteado que el crecimiento lento observado en ciertas especies de la clase Anaerolineae, como *Aggregatilinea lenta*, podría ser una respuesta adaptativa a las condiciones de baja disponibilidad de energía y nutrientes características de su entorno natural (Nakahara et al., 2019). No obstante, en comunidades microbianas complejas, las tasas de crecimiento pueden diferir considerablemente de aquellas obtenidas en condiciones de laboratorio para cepas aisladas. Estas diferencias podrían explicarse por interacciones cooperativas o sintróficas con otros microorganismos, o bien por las limitaciones que implica la elección del medio de cultivo adecuado (Campanaro et al., 2020).

En este contexto, han surgido herramientas novedosas como iRep, diseñadas para estimar los tiempos de duplicación bacteriana a partir de genomas reconstruidos. Esta metodología cobra especial relevancia considerando el crecimiento exponencial de los estudios metagenómicos y la generación de genomas ensamblados. Investigaciones recientes basadas en iRep sugieren que las tasas de duplicación están relacionadas con las funciones metabólicas codificadas en los genomas. Por ejemplo, se ha observado que los microorganismos involucrados en la degradación de polisacáridos tienden a presentar valores bajos de iRep (indicando un crecimiento más rápido), mientras que aquellos implicados en procesos como la degradación de celulosa o la fijación de carbono muestran valores más altos (lo que refleja un crecimiento más lento) (Campanaro et al., 2020). La disponibilidad de estimaciones de iRep para numerosas especies, junto con su vinculación a funciones ecológicas específicas, ofrece una vía prometedora para comprender la dinámica de crecimiento microbiano en procesos como la digestión aeróbica. Esta aproximación permite además superar la limitación de depender exclusivamente de organismos cultivables.

Una hipótesis adicional sostiene que ciertos microorganismos podrían requerir, para su crecimiento en cultivo, compuestos producidos por otros integrantes de la comunidad, o incluso depender directamente de su presencia. En este sentido, se ha propuesto la existencia de interacciones sinérgicas entre miembros del filo Chloroflexota y arqueas metanogénicas, lo que ha sido documentado en diversos estudios (Wiegant & de Man, 1986).

Debido a esta dificultad en obtener aislamientos en cultivo puro, es difícil obtener información sobre la fisiología de estos microorganismos. En la tabla 23 se presenta la información encontrada para cada género, esta información proviene de los trabajos de descripción de los dos

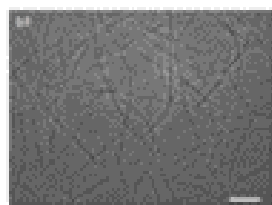
géneros que presentan aislamientos (*Anaerolinea* y *Leptolinea*), y de los trabajos que presentan datos de los genomas obtenidos a partir de metagenomas, estos datos fueron incluidos en la base de datos de MiDAS 5. La información recabada muestra que estos microorganismos presentan morfología filamentosa, y son fermentadores de carbohidratos, aminoácidos y muchos de ellos almacenan glucógeno. Esta información sugiere que el rol de estos microorganismos es la degradación de materia orgánica disponible en las aguas residuales tratadas en estas plantas.

Tabla 23. Información sobre los géneros predominantes en las PTARs analizadas de acuerdo a la bibliografía.

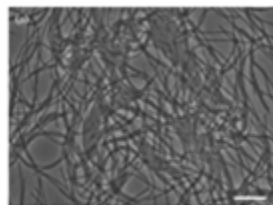
Género	Morfología (Largo × ancho (μm))	sonda FISH	Potencial metabólico				Referencia	Tipo PTAR donde se detectaron
			Fisiología	Fuente de carbono	Aceptor de electrones	Polímero de almacenamiento intracelular*		
<i>g_3043</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Celulosa
<i>g_10673</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Celulosa
<i>g_10496</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Celulosa
<i>Ca_Tricholinea</i> (antes <i>g_9648</i>)	Filamentosa (10-60 x 0,5-0,9) μm	CFX166 CFXmix EUBmix2	NA	NA	NA	Glucógeno	(Petriglieri et al., 2023)	Domésticos
<i>Leptolinea</i>	Filamentosa	NA	Heterótrofo Anaerobio facultativo	Carbohidratos aminoácidos	NA	Glucógeno	(Yamada et al., 2006)	DomésticosMa ltería
<i>g_859</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Domésticos Frigorífico
<i>g_882</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Domésticos
<i>g_5463</i> (parte del genero <i>Ca_Defluviifilum</i>)	Filamentosa (20-250x0,8-1,3) μm	CFX1243 CFXmix, EUBmix	NA	NA	NA	Glucógeno	(Petriglieri et al., 2023)	Domésticos Frigorífico Maltería Mermelada
<i>g_2527</i>			NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Frigoríficos
<i>Anaerolinea</i>	Filamentosa	CFX64	Heterótrofo Anaerobio	Carbohidratos aminoácidos	NA	NA	(Nierychlo et al., 2019; Sekiguchi et al. 2003)	Maltería Domésticos

Género	Morfología (Largo × ancho (µm))	sonda FISH	Potencial metabólico				Referencia	Tipo PTAR donde se detectaron
			Fisiología	Fuente de carbono	Aceptor de electrones	Polímero de almacenamiento intracelular*		
Ca_Sarcinithrix (antes g_425) (Bacterias filamentosas muy extendidas en PTAR de lodos activados, asociada a problemas bulking)	Filamentos individuales Células Gram negativas tienen una forma cuadrada distintiva	CFX499 CFX1151 CFXmix EUBmix	Heterótrofo* anaerobio facultativo*	Carbohidrato*	O ₂ *, NO ₃ *	Glucógeno	(Speirs et al., 2011; Nierychlo et al., 2019)	Mermelada
g_4042	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Mermelada
Ca_Amarobacter (antes g_731)	Forma de bastón (1-2 x 0,3-0,5) µm	CFX193 CFXmix EUBmix2	Heterótrofo Aerobico	Carbohidratos aminoácidos proteínas	- O ₂ , NO ₃	Glucógeno	(Petriglieri et al., 2023)	Mermelada
g_1668 (antes Ca. Catenibacter)	Filamentosa (40 y 160 × 1-1,5) µm	CFX86a CFXmix EUBmix3	NA	NA	NA	NA	(Speirs et al., 2019)	Vitivinicola
g_2138			NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Vitivinicola
g_1360			NA	NA	NA	NA	(Dueholm et al., 2022)	Vitivinicola

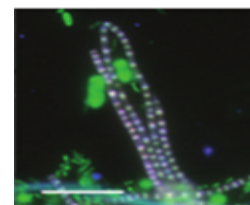
La anotación metabólica se determinó mediante anotación metabólica (sin asterisco) o se validó experimentalmente (*); NA = no applicable; = negativo. (Extrado de Petriglieri et al., 2023)



Leptolinea



Anaerolinea



Ca_Sarcinithrix

Fuente: MiDAS 5

La elevada diversidad filogenética observada en el filo Chloroflexota no solo refleja su capacidad de adaptación a matrices químicas variadas, sino también su potencial funcional en la red trófica microbiana del lodo activado. Estos hallazgos subrayan la importancia de este filo como un componente estructural y funcionalmente relevante de las comunidades microbianas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

¿Difieren según el tipo de agua residual que tratan los sistemas?

Los análisis multivariados realizados sobre las secuencias asignadas al filo Chloroflexota permitieron observar diferencias en la composición de su comunidad entre los distintos tipos de agua residual tratada. El análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis mostró un patrón de agrupamiento consistente con el tipo de industria y la composición del agua residual, tanto a nivel de comunidad microbiana total como específicamente para el filo Chloroflexota. Esto sugiere que la estructura de esta comunidad microbiana está influenciada de manera importante por las características del efluente tratado.

En particular, se evidenció una clara diferenciación de la comunidad asociada al reactor de la industria vitivinícola, la cual mostró una estructura distinta al resto, probablemente como resultado de su producción estacional, las altas cargas orgánicas asociadas a compuestos como taninos, etanol y ácidos orgánicos, y el diseño particular de la planta (sistema de aireación de Venturini). De igual forma, las muestras de las plantas que tratan efluentes domésticos, de frigoríficos, de celulosa y de la maltería tendieron a agruparse, reflejando la similitud química de sus efluentes ricos en polímeros de compleja degradación como proteínas, lípidos, celulosa, lignina, etc., lo que podría seleccionar una estructura de comunidad microbiana similar.

Las plantas de tratamiento de las industrias de celulosa y de efluentes domésticos, por ejemplo, mostraron mayor dispersión en la composición de sus comunidades, lo cual podría deberse a variaciones estacionales en la carga de entrada o a inestabilidades operativas. Por el contrario, los sistemas de tratamiento de las industrias de mermelada y vitivinícola presentaron una menor variabilidad, probablemente asociada a regímenes de operación más predecibles o a un diseño del sistema que amortigua las fluctuaciones en la composición del efluente.

Estos hallazgos coinciden con otros estudios que describen cómo el tipo de sustrato, la complejidad del agua residual y el diseño del reactor influyen en la conformación de la microbiota asociada al tratamiento (Yang et al., 2020; Petriglieri et al., 2023). En consecuencia, la comunidad del filo Chloroflexota no solo responde al ambiente físico-químico del reactor, sino que se estructura o conforma según las características del agua residual tratada.

¿Tienen morfología filamentosa?

La técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) permitió confirmar que en cinco de los diez sistemas analizados se detectó organismos del filo Chloroflexota con morfología filamentosa, característica ampliamente reportada en la literatura para este grupo (Yamada et al., 2005; Petriglieri et al., 2023). La hibridación positiva con sondas específicas (GNSB941 y CFX1223) y la observación por microscopía confocal revelaron una distribución de estos filamentos tanto en el interior como en la periferia de los flóculos, formando redes interconectadas que sugieren un rol de andamiaje dentro de la biomasa.

Este patrón espacial apoya la hipótesis de que los organismos del filo Chloroflexota, especialmente de la clase Anaerolineae, participa activamente en la formación y estabilización de flóculos y, posiblemente, en etapas iniciales de agregación microbiana (Sekiguchi et al., 1999; Nielsen et al., 2009). Este comportamiento ha sido asociado con la llamada “teoría del espagueti”, que propone que bacterias filamentosas actúan como un red de andamiaje para la formación de flóculos y gránulos (Wiegant & de Man, 1986).

La morfología filamentosa observada también está alineada con su rol como bacterias hidrolíticas, al facilitar el acceso a polímeros orgánicos en la interfase sólido-líquido del flóculo. Esta localización estratégica sugiere que su estructura alargada favorece la interacción con sustratos complejos, como celulosa, pectinas o proteínas, lo que podría explicar su proliferación en matrices químicas ricas en polímeros (Yamada et al., 2007).

Además, la distribución de las bacterias del filo Chloroflexota observada en este estudio coincide con la reportada en estudios previos sobre sistemas de lodos activados aeróbicos y sistemas anaeróbicos, donde se destaca su capacidad para formar parte de comunidades filamentosas complejas, y su contribución a la retención de biomasa en el reactor (Zhang et al., 2019). Su

presencia en diversas plantas de tratamiento de aguas residuales industriales sugiere que este rasgo morfológico no es circunstancial, sino una característica funcional clave en el ecosistema microbiano de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

En las muestras de cinco PTARs (Ce2, F1, F2, D1 y D2), no fue posible verificar la presencia de microorganismos filamentosos con las sondas empleadas. Sin embargo, sí se detectó señal positiva con las sondas en estas muestras. Este resultado podría explicarse por posibles limitaciones metodológicas que impidieron la visualización de la morfología filamentosa, como la presencia de exopolímeros u otros compuestos que puedan interferir con la detección, o bien porque los filamentos se encontraran dentro de los flóculos, impidiendo su observación. Otra hipótesis es que los microorganismos del filo Chloroflexota presentes en dichas muestras no sean blanco de las sondas utilizadas. Esta última posibilidad es plausible en el caso de las muestras F1 y F2 (de frigorífico), ya que en estas predominan microorganismos de géneros no identificados y diferentes a los que se detectaron en las muestras en las que sí se observaron filamentos. Sin embargo, en la muestra Ce2 predominan microorganismos similares a los de Ce1, y en las muestras D1 y D2 predominan los mismos microorganismos que en D3; en ambas, tanto en Ce1 como en D3, se detectaron filamentos que hibridaron con las sondas (tabla 21). Se requieren estudios adicionales para comprender mejor estos resultados y descartar posibles limitaciones metodológicas.

¿Existe una relación entre la abundancia de estos microorganismos y la sedimentabilidad del lodo?

La comparación entre los resultados de abundancia de bacterias del filo Chloroflexota, los resultados de la sedimentabilidad de los lodos y las observaciones microscópicas permitió evaluar su posible implicancia en la sedimentabilidad de la biomasa. Se encontró que todos los sistemas evaluados presentaron hibridación positiva con sondas específicas para el filo Chloroflexota y que estas bacterias en varias muestras presentaban morfología filamentosa. No obstante, no en todos los casos se observaron problemas operacionales de bulking o deficiente sedimentación, lo cual indica que su presencia por sí sola no es un factor determinante.

Se observó que en plantas con alta abundancia de bacterias del filo Chloroflexota y simultáneamente valores elevados de sedimentabilidad (por encima de 900 mL/L), como las industrias de maltería, vitivinícola, frigorífico y algunas de las PTARs de tratamiento de efluente doméstico, se reportaron problemas de sedimentación, flóculos abiertos o poco compactos, y presencia de filamentos sobresaliendo del flóculo. Este patrón sugiere que, a partir de ciertos umbrales de abundancia, estos microorganismos podrían contribuir al deterioro de la calidad del lodo, actuando como desencadenantes de episodios de bulking filamentoso (Yoon et al., 2010; Nittami et al., 2017).

Sin embargo, también se identificaron plantas como las de celulosa (Ce1 y Ce2) o la frigorífica F2, con valores altos del filo Chloroflexota, pero sin problemas graves de sedimentabilidad reportados, lo que sugiere que el efecto de estos microorganismos está mediado por otros factores, como el diseño del reactor, la proporción de otros grupos filamentosos y el régimen de operación. De hecho, estudios recientes advierten que tanto la subabundancia como la sobreabundancia de bacterias filamentosas pueden comprometer la estabilidad del flóculo, siendo necesaria una proporción equilibrada para mantener la estructura del lodo y su adecuada sedimentación (Petriglieri et al., 2023).

Resultados similares se reportaron por Nittami et al., 2019, en el que no se encontró una correlación positiva entre la sedimentabilidad del lodo y la abundancia de *Kuleothrix*.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia del filo Chloroflexota, en particular miembros de la clase Anaerolineae, puede estar asociada a la conformación estructural de los flóculos y al desempeño sedimentario, pero que su efecto depende del contexto ecológico y operativo de cada planta. La ausencia de problemas complejos de bulking en algunas de las plantas muestreadas, pese a la alta presencia de bacterias filamentosas, refuerza la necesidad de definir umbrales funcionales de abundancia y estudiar en profundidad la interacción con otros grupos microbianos presentes en los sistemas.

Implicancias ecológicas y funcionales

La presencia extendida y diversa del filo Chloroflexota en todas las plantas de tratamiento de aguas residuales analizadas subraya su importancia ecológica en sistemas de lodos activados. En particular, la dominancia de la clase Anaerolineae, observada de forma consistente a lo largo del tiempo, indica una adaptación funcional estable a condiciones operacionales aeróbicas, a pesar de que sus representantes cultivados son anaerobios. Esta aparente plasticidad ecológica podría explicarse mediante relaciones sintróficas o adaptaciones fisiológicas que les permiten participar activamente en la degradación de compuestos orgánicos incluso bajo condiciones oxidativas moderadas.

Desde el punto de vista funcional, los miembros del filo Chloroflexota participan en la hidrólisis y fermentación de materia orgánica compleja, como polisacáridos y restos celulares, lo que los posiciona como actores clave en la fase inicial del procesamiento biológico de los efluentes. Su morfología filamentosa, confirmada en este trabajo mediante FISH, permite su integración estructural dentro de los flóculos, donde contribuyen a la estabilidad mecánica de la biomasa. Sin embargo, su sobreabundancia también se ha vinculado a fenómenos de bulking, lo que resalta la necesidad de un equilibrio dinámico en la comunidad microbiana.

Conclusiones y perspectivas

Este estudio constituye uno de los primeros esfuerzos sistemáticos a nivel nacional para caracterizar la diversidad, morfología y abundancia del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados bajo condiciones operacionales reales en Uruguay. La evidencia obtenida demuestra que este filo bacteriano está no sólo ampliamente distribuido en los sistemas estudiados, sino que también cumple un rol estructural y funcional fundamental en la eficiencia de los procesos de lodos activados.

La observación de una diversidad de géneros no cultivados resalta la necesidad de profundizar en su fisiología y dinámica poblacional. En particular, la clase Anaerolineae se perfila como un componente estratégico en la estabilidad del sistema y en la respuesta ante perturbaciones externas, como variaciones en carga orgánica o temperatura.

Como perspectiva futura, se recomienda fortalecer los estudios de cultivos dirigidos y cultivos enriquecidos para el aislamiento de representantes del filo Chloroflexota, así como emplear herramientas de metagenómica y transcriptómica para comprender en profundidad su potencial metabólico y adaptaciones funcionales. Adicionalmente, es clave profundizar en el modelado de redes microbianas a fin de comprender mejor las interacciones entre el filo Chloroflexota y otros taxones relevantes para el tratamiento de aguas residuales y los tratamiento biológico, con el objetivo de desarrollar estrategias de manejo más robustas, eficientes y sostenibles.

Bibliografía

- Amann, R. I., and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 339–348. doi: 10.1038/nrmicro1888
- Alfonso Correa, L. A., & Vargas Guerrero, L. T. (2018). *Desarrollo de una propuesta para el tratamiento de aguas residuales proveniente del proceso de producción de pulpas de fruta de la empresa Alimentos SAS S.A.S. Bogotá- Colombia: Fundación Universidad De América.*
- Balcárcel G., L. M., Erazo H., P. N., Vides G., A. M., & Ramírez P., A. (2014). Parámetros fisicoquímicos asociados a la proliferación de bacterias filamentosas (Bulking filamentoso) en las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados: revisión sistemática. *Hechos Microbiológicos*, 3(2), 47–58. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.18736>.
- Beer, M., Seviour, E. M., Kong, Y., Cunningham, M., Blackall, L. L., & Seviour, R. J. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS microbiology letters*, 207(2), 179-183.
- Björnsson, H. Tyson and Blackall (2002). Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, 148, 2309-2318.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., and Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 850–852. doi: 10.1038/s41587-019-0190-3
- Bonilla Sylvia, Haakonson S, Somma A, Gravier A, Britos A, Vidal L, De León L, Brena B, Pérez M, Piccini C, Martínez G, Chalar G, González M, Martigani F y Aubriot L. 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTECH Vol. 10*. 9-22.
- Borzacconi, L., López, I., Passeggi, M., Etchebehere, C., & Barcia, R. (2008). Sludge deterioration in a full scale UASB reactor after a pH drop working under low loading conditions. *Water Science and Technology*, 57(5), 797-802.
- Bovio, P., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2019). Preliminary analysis of Chloroflexi populations in full-scale UASB methanogenic reactors. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 667–683. <https://doi.org/10.1111/jam.14115>

- Bovio-Winkler, P., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2021). Database mining to unravel the ecology of the phylum Chloroflexi in methanogenic full scale bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 11, 603234.
- Bovio-Winkler, P., Guerrero, L. D., Erijman, L., Oyarzúa, P., Suárez-Ojeda, M. E., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2023). Genome-centric metagenomic insights into the role of Chloroflexi in anammox, activated sludge and methanogenic reactors. *BMC microbiology*, 23(1), 45.
- Cabezas, A., Bovio, P., & Etchebehere, C. (2020). Commercial formulation amendment transiently affects the microbial composition but not the biogas production of a full scale methanogenic UASB reactor. *Environmental Technology*, 41(24), 3119-3133.
- Callejas, C., Fernández, A., Passeggi, M., Wenzel, J., Bovio, P., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2019). Microbiota adaptation after an alkaline pH perturbation in a full-scale UASB anaerobic reactor treating dairy wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(12), 2035-2046.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Caluwé, M., Dobbeleers, T., Daens, D., Geuens, L., Dries, J., & Blust, R. (2017). The effect of the feeding pattern of complex industrial wastewater on activated sludge characteristics and the chemical and ecotoxicological effluent quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 10796–10807. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/s11356-017-8712-3>
- Campanaro, S., Treu, L., Rodriguez-R, L. M., Kovalovszki, A., Ziels, R. M., Maus, I., Zhu, X., Kougias, P. G., Basile, A., Luo, G., Schlüter, A., Konstantinidis, K. T., & Angelidaki, I. (2020). New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–18. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1186/s13068-020-01679-y>
- Castelló, E., y Santos, C. G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682.
- Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Geneva: World Health Organization; 1999.

- Costa, M. C. M. S., Carvalho, L., Leal, C. D., Dias, M. F., Martins, K. L., Garcia, G. B., ... & Calabria Araujo, J. (2014). Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. *Environmental technology*, 35(14), 1811-1822.
- Cotto, A., Looper, J. K., Mota, L. C., & Son, A. (2015). Quantitative polymerase chain reaction for microbial growth kinetics of mixed culture systems. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1928–1935. <https://doi.org/10.4014/jmb.1503.03090>
- Daigger, G. T. (2014). “Arden and Lockett remembrance,” in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 1–15.
- Dam, H. T., Vollmers, J., Sobol, M. S., Cabezas, A., & Kaster, A. K. (2020). Targeted cell sorting combined with single cell genomics captures low abundant microbial dark matter with higher sensitivity than metagenomics. *Frontiers in microbiology*, 11, 1377.
- Dueholm, M. K. D., Nierychlo, M., Andersen, K. S., Rudkjøbing, V., Knutsson, S., Albertsen, M., & Nielsen, P. H. (2022). MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature communications*, 13(1), 1908.
- Dueholm, M.K.D., Andersen, K.S., Korntved, AK.C. et al. MiDAS 5: Global diversity of bacteria and archaea in anaerobic digesters. *Nat Commun* 15, 5361 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49641-y>
- Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., & Muxi, L. (2002). Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbial Ecology*, 40(2), 97-106.
- Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., and Humpage, A. R. (2017). Cyanotoxins: which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Res.* 118, 227–238. doi: 10.1016/j.watres.2017.04.025
- Garrity, G. M., Holt, J. G., Castenholz, R. W., Pierson, B. K., Keppen, O. I., & Gorlenko, V. M. (2001). Phylum BVI. Chloroflexi ph. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 427-446). Springer, New York, NY.
- Gich, F., Garcia-Gil, J., & Overmann, J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Archives of microbiology*, 177, 1-10.
- Jenkins, D., and Wanner, J. (2014). *Activated Sludge-100 Years and Counting*. London: IWA Publishing.
- Júnior, A. D. N. F., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed

- reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology*, 186, 81-88.
- Kerekes, J. J. (1982). The application of phosphorus load-trophic response relationships to reservoirs. *Canadian Water Resources Journal*, 7(1), 349-354.
- Kragelund, C., Caterina, L., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., ... & Nielsen, P. H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS microbiology ecology*, 59(3), 671-682.
- Kragelund, C., Thomsen, T. R., Mielczarek, A. T., & Nielsen, P. H. (2011). Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 451-462.
- Lofrano, G., and Brown, J. (2010). Wastewater management through the ages: a history of mankind. *Sci. Total Environ.* 408, 5254–5264. doi: 10.1016/j.scitotenv. 2010.07.062
- Lopez, I. (2016) The potential of biogas production in Uruguay. *Renew Sustain Energy Rev* 54, 1580–1591. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.099>.
- McIlroy, S. J., Starnawska, A., Starnawski, P., Saunders, A. M., Nierychlo, M., Nielsen, P. H., & Nielsen, J. L. (2016). Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental Microbiology*, 18(1), 50–64. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1111/1462-2920.12614>
- McIlroy, S. J., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., Fernando, E., Karst, S. M., Albertsen, M., et al. (2017). Culture-Independent analyses reveal novel Anaerolineaceae as abundant primary fermenters in anaerobic digesters Treating waste activated sludge. *Front. Microbiol.* 8:1134. doi: 10.3389/fmicb. 2017.01134
- Mesa Técnica del Agua (2017, marzo). Informe de asesoría a la Mesa Técnica del Agua. Documento técnico n° 1: Establecimiento de niveles guía de indicadores de estado trófico en cuerpos de agua superficiales. Ministerio de Ambiente – DCA. Recuperado de: <https://www.ambiente.gub.uy/oan/documentos/DCA-MesaT%C3%A9cnicaAgua-MVOTM-A-propuesta-NIVELES-GUIA-N-P-Clo-grupo-t%C3%A9cnico-FINAL-20.03.171.pdf>
- Mittal, A. (2011). Biological wastewater treatment. *Water today*, 1, 32-44.
- Montoya Alvarez, L. F., & Ospina Gil, A. (2013). *Evaluación de la tratabilidad de la mezcla de aguas residuales procedentes del sector Maltería en Manizales*. Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, <https://repositorio.utp.edu.co/entities/publication/44cea135-91dd-4b34-b965-81ce988f62b1>
- Nakahara, N., Nobu, M. K., Takaki, Y., Miyazaki, M., Tasumi, E., Sakai, S., ... & Imachi, H. (2019). *Aggregatilinea lenta* gen. nov., sp. nov., a slow-growing, facultatively anaerobic bacterium isolated from subseafloor sediment, and proposal of the new order

- Aggregatilineales ord. nov. within the class Anaerolineae of the phylum Chloroflexi. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(4), 1185-1194.
- Narihiro, T., Nobu, M. K., Kim, N.-K., Liu, W.-T., & Kamagata, Y. (2015). The nexus of syntrophy-associated microbiota in anaerobic digestion revealed by long-term enrichment and community survey. *Environmental Microbiology*, 17(5), 1707–1720. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1111/1462-2920.12616>
- Nielsen, P. H., Daims, H., Lemmer, H., Arslan-Alaton, I., and Olmez-Hanci, T. (2009). FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. *London: IWA Publishing*.
- Nielsen, P. H., and McMahon, K. D. (2014). “Microbiology and microbial ecology of the activated sludge process,” in *Activated Sludge – 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 53–75.
- Nierychlo, M., Milobedzka, A., Petriglieri, F., McIlroy, B., Nielsen, P. H., and McIlroy, S. J. (2019). The morphology and metabolic potential of the Chloroflexi in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95:fiy228. doi: 10.1093/femsec/fiy22
- Noguera, D. R., Wright, E. S., Camejo, P., and Yilmaz, L. S. (2014). Mathematical tools to optimize the design of oligonucleotide probes and primers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9595–9608. doi: 10.1007/s00253-014-6165-x
- Nierychlo, M., Andersen, K. S., Xu, Y., Green, N., Jiang, C., Albertsen, M., et al. (2020). MiDAS 3: an ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level microbiome composition of activated sludge. *Water Res.* 182:115955. doi: 10.1016/j.watres.2020.115955
- Nittami, T., Speirs, L.B.M., Yamada, T., Suzuki, I., Fukuda, J., Kurisu, F. and Seviour, R.J. (2017) Quantification of Chloroflexi Eikelboom morphotype 1851 for prediction and control of bulking events in municipal activated sludge plants in Japan. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 3861–3869. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8077-4>.
- Nittami, T., Shoji, T., Koshiba, Y., Noguchi, M., Oshiki, M., Kuroda, M., ... & Kurisu, F. (2019). Investigation of prospective factors that control *Kouleothrix* (Type 1851) filamentous bacterial abundance and their correlation with sludge settleability in full-scale wastewater treatment plants. *Process Safety and Environmental Protection*, 124, 137-142.
- Nittami, T., Kasakura, R., Kobayashi, T., Suzuki, K., Koshiba, Y., Fukuda, J., ... & Seviour, R. J. (2020). Exploring the operating factors controlling *Kouleothrix* (type 1851), the dominant filamentous bacterial population, in a full-scale A2O plant. *Scientific Reports*, 10(1), 6809.
- Nittami, T., Ishizuka, N., Sakurai, Y., & Seviour, R. J. (2025). The impact of biotic and abiotic interactions on *Candidatus Kouleothrix* bulking in a full-scale activated sludge anaerobic-anoxic-oxic plant in Japan. *Scientific Reports*, 15(1), 1-11.

- Parks, D. H., Chuvochina, M., Chaumeil, P. A., Rinke, C., Mussig, A. J., & Hugenholtz, P. (2020). A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nature biotechnology*, 38(9), 1079-1086.
- Pereira, E.L., de Paiva, T.C.B. & da Silva, F.T. Physico-chemical and Ecotoxicological Characterization of Slaughterhouse Wastewater Resulting from Green Line Slaughter. *Water Air Soil Pollut* **227**, 199 (2016).
<https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/s11270-016-2873-4>
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D. F., Borzacconi, L., ... & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1), 54-62.
- Petriglieri, F., Kondrotaitė, Z., Singleton, C., Nierychlo, M., Dueholm, M. K., & Nielsen, P. H. (2023). A comprehensive overview of the Chloroflexota community in wastewater treatment plants worldwide. *Msystems*, 8(6), e00667-23.
- Puyol, D., Batstone, D. J., Hülsen, T., Astals, S., Peces, M., and Kromer, J. O. (2016). Resource recovery from wastewater by biological technologies: opportunities, challenges, and prospects. *Front. Microbiol.* 7:2106. doi: 10.3389/fmicb.2016. 02106
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A., Humbert, J-F. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–ecology, toxin production and risk management. *Water Res.* 15, 5464–5479. doi: 10.1016/j.watres.2013.06.042
- Seguel Suazo, K., Dobbeleers, T., & Dries, J. (2024). Bacterial community and filamentous population of industrial wastewater treatment plants in Belgium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 43.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., & Harada, H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1280-1288.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., & Harada, H. (2000). *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 771-779.
- Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., & Harada, H. (2001). In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green

- non-sulfur bacteria, subdivision I. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5740-5749.
- Seviour, R. J. (2010). "Factors affecting the bulking and foaming filamentous bacteria in activated sludge," in *Microbial Ecology of Activated Sludge*, eds R. J. Seviour, and P. H. Nielsen, (London: IWA Publishing), 139–168.
- Sharpley A. N. (2015). El fósforo en la agricultura y el medio ambiente: desafíos para la ciencia, la práctica y la política. *IV Simposio Nacional de Agricultura, Buscando el camino para la intensificación sostenible de la agricultura*. Paysandú, Uruguay.
- Speirs, L., Nittami, T., McIlroy, S., Schroeder, S., & Seviour, R. J. (2009). Filamentous bacterium Eikelboom type 0092 in activated sludge plants in Australia is a member of the phylum Chloroflexi. *Applied and environmental microbiology*, 75(8), 2446-2452.
- Speirs, L. B., McIlroy, S. J., Petrovski, S., & Seviour, R. J. (2011). The activated sludge bulking filament Eikelboom morphotype 0914 is a member of the Chloroflexi. *Environmental Microbiology Reports*, 3(2), 159-165.
- Speirs, L. B., Dyson, Z. A., Tucci, J., & 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(10), fix115.
- Speirs, L. B. M., Rice, D. T. F., Petrovski, S., & Seviour, R. J. (2019). The Phylogeny, Biodiversity, and Ecology of the Chloroflexi in Activated Sludge. *Frontiers in Microbiology*, 10 (September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02015>
- Stes, H., Aerts, S., Caluwé, M., Dobbeleers, T., Wuyts, S., Kiekens, F., D'aes, J., Langhe, P. D., & Dries, J. (2018). Formation of aerobic granular sludge and the influence of the pH on sludge characteristics in a SBR fed with brewery/bottling plant wastewater. *Water Science & Technology*, 77(9), 2253–2264. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.2166/wst.2018.132>
- Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Matsuura, N., Tourlousse, D. M., Meng, X. Y., ... & Sekiguchi, Y. (2016). Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class Anaerolineae in the phylum Chloroflexi. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 988-996.
- Thiel, V., Fukushima, S. I., Kanno, N., & Hanada, S. (2019). Chloroflexi. *Encyclopedia of Microbiology*, 651–662. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20771-1>
- Ugarte, S., Fernández Llano, J. C., Arreghini, M., Denita, L., & Herrero, C. (2000). Parámetros de diseño para el tratamiento biológico aerobio de efluentes de la industria vitivinícola. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 4.

- van Loosdrecht, M., Seah, H., Wah, Y. L., and Cao, Y. (2014). "The next 100 years," in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 407–424.
- Wanner, J., and Jobbagy, A. (2014). "Solids separation," in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 171–194.
- Wertz, J. L., Mercier, J. P., & Bédoué, O. (2010). *Cellulose science and technology*. CRC Press.
- Wiegant, W. M., & De Man, A. W. A. (1986). Granulation of biomass in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewaters. *Biotechnology and bioengineering*, 28(5), 718-727.
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., ... & Zhou, J. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature microbiology*, 4(7), 1183-1195.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., & Harada, H. (2005). Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7493-7503.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., & Kamagata, Y. (2006). *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1331-1340.
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., & Sekiguchi, Y. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2299-2306.
- Yamada, T., & Sekiguchi, Y. (2009). Cultivation of uncultured chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi subphylum I with natural and biotechnological relevance. *Microbes and Environments*, 24(3), 205-216.
- Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., & Qiao, Z. (2020). Activated sludge microbial community and treatment performance of wastewater treatment plants in industrial and municipal zones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 436. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020436>

- Yoon, D. N., Park, S. J., Kim, S. J., Jeon, C. O., Chae, J. C., & Rhee, S. K. (2010). Isolation, characterization, and abundance of filamentous members of Caldilineae in activated sludge. *The Journal of Microbiology*, 48, 275-283.
- Zhang, M., Yao, J., Wang, X., Hong, Y., & Chen, Y. (2019). The microbial community in filamentous bulking sludge with the ultra-low sludge loading and long sludge retention time in oxidation ditch. *Scientific Reports*, 9(1), 13693.
- Zheng, M., He, S., Feng, Y., Wang, M., Liu, Y. X., Dang, C., & Wang, J. (2021). Active ammonia-oxidizing bacteria and archaea in wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Sciences*, 102, 273-282.

ANEXO

Resultados de qPCR y Secuenciación masiva. Número de copias del gen del ARNr 16S para el filo Chloroflexota por ng de ADN total. Nomenclatura: Tipo de industria abreviada; número de planta;-número de muestreo; letra (indica si se tomó muestras más de una vez el mismo día en diferentes lugares de la planta de tratamiento de aguas residuales. Ejemplo: Ce1-2b (Celulosa1-muestra 2 y segundo punto (b))

Fecha	Cód. mtra	Sec. Masiva (SI/NO)	qPCR (N° de copias/ng de ADN)	SD	Tipo de industria
30/5/2023	Ce1-1	SI	9,16E+03	3,88E+02	Celulosa
11/8/2023	Ce1-2a	SI	1,64E+04	8,56E+02	Celulosa
11/8/2023	Ce1-2b	SI	7,51E+03	5,97E+02	Celulosa
31/5/2023	Ce2-1a	SI	1,64E+03	5,46E+00	Celulosa
31/5/2023	Ce2-1b	SI	6,87E+02	2,15E+02	Celulosa
11/8/2023	Ce2-2a	SI	7,00E+04	3,28E+03	Celulosa
11/8/2023	Ce2-2b	SI	2,19E+02	1,12E+01	Celulosa
27/7/2023	Ma-1	SI	x	x	Maltería
26/8/2023	Ma-2	SI	4,84E+04	8,69E+03	Maltería
14/11/2023	Ma-3	SI	3,18E+04	8,92E+02	Maltería
29/11/2023	Ma-4	SI	4,35E+03	6,05E+01	Maltería
13/11/2023	Me-1a	SI	9,12E+03	1,05E+03	Mermelada
13/11/2023	Me-1b	SI	x	x	Mermelada
17/4/2024	Me-2a	SI	6,09E+03	2,63E+02	Mermelada
17/4/2024	Me-2b	SI	8,97E+03	1,67E+03	Mermelada
15/5/2024	Me-3a	SI	4,36E+03	6,92E+02	Mermelada
15/5/2024	Me-3b	SI	2,58E+03	0,00E+00	Mermelada
17/6/2024	Me-4a	SI	5,84E+03	3,07E+02	Mermelada
17/6/2024	Me-4b	SI	8,48E+02	1,64E+02	Mermelada
25/7/2024	Me-5a	SI	4,47E+02	2,20E+01	Mermelada
25/7/2024	Me-5b	SI	2,14E+03	1,93E+02	Mermelada
19/8/2022	V1-1	SI	x	x	Vitivinicola
23/3/2023	V1-2	SI	x	x	Vitivinicola
11/5/2023	V1-3a	SI	4,71E+03	3,19E+02	Vitivinicola
11/5/2023	V1-3b	SI	8,39E+03	3,57E+02	Vitivinicola
30/5/2023	V1-4	SI	1,69E+03	1,91E+02	Vitivinicola
		Sec. Masiva	qPCR	SD	

Fecha	Cód. mtra	(SI/NO)	(N° de copias/ng de ADN)		Tipo de industria
6/6/2023	V1-6	SI	6,33E+03	7,91E+02	Vitivinicola
13/6/2023	V1-7	SI	3,87E+03	2,30E+02	Vitivinicola
15/6/2023	V1-8	SI	4,70E+03	3,03E+02	Vitivinicola
19/6/2023	V1-9	SI	6,24E+03	7,13E+02	Vitivinicola
22/6/2023	V1-10	SI	4,64E+03	8,36E+01	Vitivinicola
26/6/2023	V1-11	SI	5,30E+03	2,25E+03	Vitivinicola
31/7/2023	V1-12	SI	5,51E-01	7,79E-02	Vitivinicola
1/8/2023	V1-13	SI	x	x	Vitivinicola
8/8/2023	V1-14	SI	1,60E+03	1,44E+02	Vitivinicola
6/3/2023	F1-1a	SI	x	x	Frigorifico
6/3/2023	F1-1b	SI	x	x	Frigorifico
6/3/2023	F1-1c	SI	x	x	Frigorifico
30/6/2023	F1-2a	SI	1,46E+03	3,80E+02	Frigorifico
30/6/2023	F1-2b	SI	2,47E+03	4,25E+02	Frigorifico
30/6/2023	F1-2c	SI	5,62E+03	4,51E+02	Frigorifico
25/10/2023	F1-3	SI	2,02E+02	1,37E+01	Frigorifico
18/12/2023	F1-4	SI	2,65E+04	3,42E+03	Frigorifico
25/10/2023	F2-1a	SI	2,67E+04	2,91E+03	Frigorifico
25/10/2023	F2-1b	SI	6,73E+03	6,98E+01	Frigorifico
18/12/2023	F2-2a	SI	1,12E+04	3,34E+03	Frigorifico
18/12/2023	F2-2b	SI	1,74E+04	6,05E+01	Frigorifico
8/2/2024	F2-3a	SI	1,40E+04	1,39E+03	Frigorifico
8/2/2024	F2-3b	SI	1,50E+04	1,65E+03	Frigorifico
25/7/2024	F2-4a	SI	6,05E+03	1,15E+02	Frigorifico
25/7/2024	F2-4b	SI	1,74E+04	0,00E+00	Frigorifico
2/12/2022	D1-1a	SI	x	x	Domésticos
2/12/2022	D1-1b	SI	x	x	Domésticos
2/12/2022	D1-1c	SI	x	x	Domésticos
2/12/2022	D1-1d	SI	x	x	Domésticos
11/7/2023	D1-2	SI	2,93E+04	3,34E+03	Domésticos
2/12/2022	D2-1	SI	x	x	Domésticos
11/7/2023	D2-2	SI	2,96E+04	1,59E+03	Domésticos
2/12/2022	D3-1	SI	x	x	Domésticos
11/7/2023	D3-2	SI	1,11E+03	1,87E+02	Domésticos
25/7/2024	D4-1	SI	6,68E+02	6,44E+01	Domésticos

Técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH)

1-Fijación

1. Centrifugar 1 volumen (300 μ L) de la muestra a 5000 g, 10 min. Lavar el pellet con 1X PBS, centrifugar nuevamente y resuspender el pellet en 1X PBS (300 μ L).
2. Adicionar 3 volúmenes (900 μ L) de solución fría de PFA 4%.
3. Incubar por 2 a 18 hs a 4 °C (no más de 18 hs).
4. Centrifugar a 5000 g, 10 min. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con solución 1X de PBS. Centrifugar nuevamente a 5000 g, 10 min y resuspender en solución 1X de PBS (300 μ L).
5. Agregar 1 volumen de Etanol (300 μ L) y mezclar.
6. Almacenar a -20°C. Las muestras congeladas pueden almacenarse a -20°C por meses.

2-Secado

Colocar 10 μ L de muestra en un portaobjeto, dejando secar al aire o estufa entre 46°C a 55°C. Luego que la muestra esté bien seca sobre el portaobjeto se pasa a la etapa de deshidratación: Con 1 mL de etanol 50% (25 mL de etanol y 25 mL de H₂O destilada) escurrir tocando la muestra indirectamente, dejar secar bien, repetir con alcohol 80% (40 mL de etanol y 10 mL de H₂O destilada) y 96% (48 mL de etanol y 2 mL de H₂O destilada). Siempre dejando secar bien entre alcohol y alcohol. Los portaobjetos deshidratados se pueden almacenar varias semanas en un lugar seco y sin polvo.

3- Hibridación

Para la hibridación, se colocan 10 μ L de buffer de hibridación. Lo cual para preparar 2 mL de buffer por cada portaobjeto y las sondas utilizadas consiste en:
40 μ L Tris-HCL 1M pH8
360 μ L de NaCl 5M.

700 µL de formamida (35%, para sondas CFX 941 y 1223) o si queremos una formamida al 20% se coloca 400 µl de formamida.

900 µL de agua MiliQ esterilizada (o 1200 µL si la formamida la queremos al 20%).

2 µL de SDS (siempre se agrega SDS al final, sino precipita) SDS 0,01% (Amann, 1995).

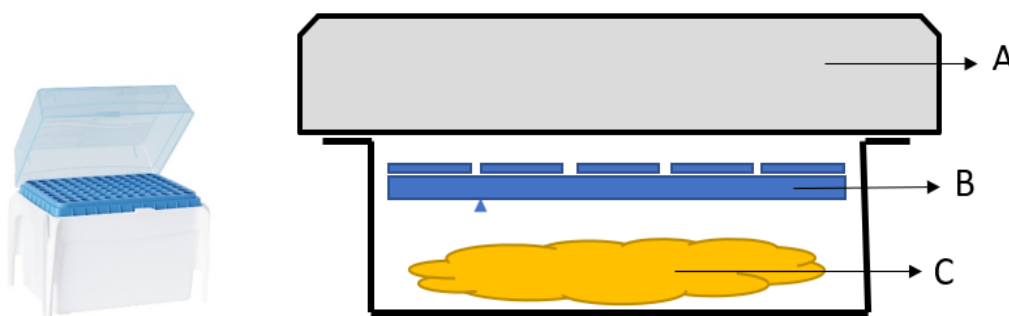
Preparar 2 mL de buffer de hibridación por porta, el buffer se prepara en el momento.

En paralelo se prepara un tubo eppendorf forrado con aluminio para hacer una solución stock del buffer de hibridación más 1 µl de cada una de las sondas [50 ng/µl] por porta (1223 Cy3 y 941 Cy3) (Björnsson, L., et al., 2002, Gich, et al., 2001) esta solución es la que va sobre las muestras previamente deshidratadas.

Por lo que si fuera para 5 muestras sería lo siguiente:

$(10 \mu\text{l de buffer de hibridación por porta}) \times 5 + (1 \mu\text{l de sonda 1223}) \times 5 + (1 \mu\text{l de sonda 941}) \times 5 = 50+10= 60 \mu\text{l para 5 porta } 12 \mu\text{l c/u.}$

Para colocar los portaobjetos se prepara una caja de tips vacía forrada con aluminio (A) (para proteger de la luz) un soporte (B) (para apoyar los portaobjetos) y un pañuelo de papel (C).



Cámara húmeda de hibridación

Luego de colocado los 2 mL de buffer sobre la muestra deshidratada en el porta, el restante sobrante se vuelca en el pañuelo de papel dentro de una caja de tips (para que quede una cámara húmeda) y se incuba a 46°C por 90 min a 4 horas en oscuridad.

Lavado de porta en vasos de bohemia de 50 mL, para remover el buffer de hibridación.
Con 1-2 mL de buffer de lavado calentado a 48°C.

<u>Para 50 mL:</u> 1 mL Tris-HCl 1M pH 8 500 µL EDTA 0,5 M	700 µL NaCl Agua MiliQ hasta 50 ml. 50 µL de SDS (siempre agregar SDS al final, sino precipita)
--	---

El buffer de lavado se prepara en el momento del lavado y se agrega DAPI (concentración final 0,025 µg/mL para ello agregar 50 µl de DAPI 25 µg/mL para 50 mL de buffer de lavado) ante de distribuir en los vasos de bohemia (tener en cuenta 50 mL x 5 = 250 mL finales).

Preparación del DAPI (DAPI Sigma 5 mg, diluir en 1 mL STOCK). Para alicuotar, partir del stock y diluir 5 µL del stock en 995 µL H₂O, para obtener una solución 25 µg/mL.
Disolver DAPI con agua nanopure para hacer una solución stock de 250 µg/mL.
Alicuotar en eppendorf de 1 mL y almacenar en la oscuridad a -20 °C (dura varios meses).

Sumergir el porta en buffer de lavado e incubar a 48 °C por 10 min.

Lavar cuidadosamente el porta con agua MiliQ o destilada fría y secar en la oscuridad a temperatura ambiente.

Una vez bien seco y protegiendo la muestra de la luz, colocar 3 µL de citifluor (una gotita) por cada muestra, cubrir con cubre y sellar en los extremos con esmalte de uñas, y volver a proteger de la luz.

Finalmente se puede observar la muestra en un Microscopio Confocal Zeiss de epifluorescencia.

Extracción de ADN utilizando el kit “Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” de Zymo Research

Colocar hasta 250 mg de muestra (lodo) al tubo de microesfera de cristal ①, más...

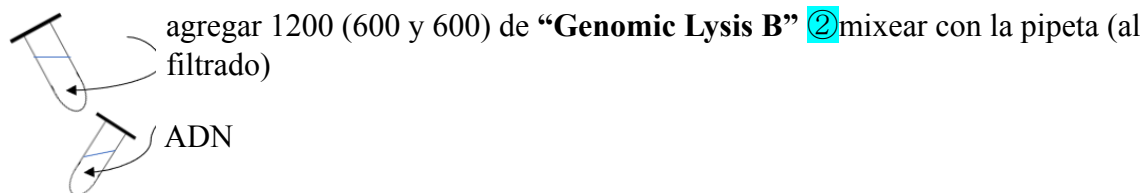
750 µL solución de lisis ① “Bashing Bead Buffer”, vortex 5 min con adaptador

Centrifugar **1 minuto x 10.000 G**

Transferir hasta 400 µL del sobrenadante a un tubo con filtro “II” ②

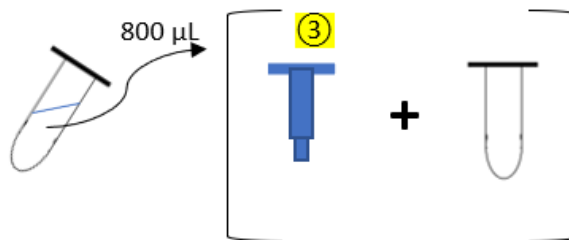
Centrifugar por **1 min. X 8.000 G**

Descartar el filtro



*** transferir 800 µL para ello...

Colocar una columna “Spin Column II” ③ y transferir el contenido del paso anterior al nuevo tubo con la columna (centrifugar **1 min x 10.000 G**)



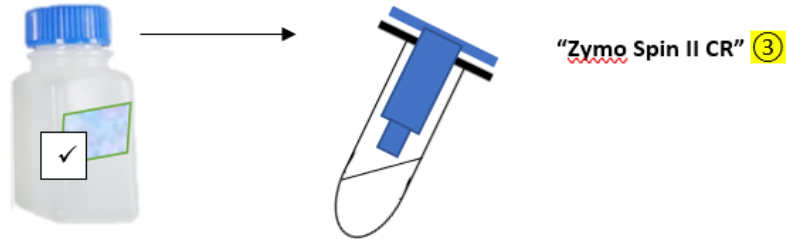
Descartar líquido (filtrado) me quedo con la columna.

Se puede reutilizar el tubo (repetir ***) $800 + 800 = 1600 \mu\text{L}$

Adicionar 200 µL de “pre-Wash Solution” ③ a columna ③ en un nuevo tubo

Centrifugar **1 min x 10.000 G**

Nota: antes de continuar, verificar que está marcado con un tick el “Wash Solution II” con el agregado de etanol.



Adicionar a la misma columna 500 μ L de **“Wash buffer”** ④ centrifugue, **1 min x 10.000 G**

Descartar el filtrado, conservó la columna

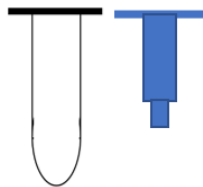
Colocar las columnas en un tubo de elución o ependorff

Adicionar 50 μ L de ADN buffer de elución ⑤ a las columnas (en la matrix de la columna)

Y centrifugar **(1/2 min) x 10.000 G**

Activación de la columna ④ para purificación final del ADN:

Colocar un filtro **“Zymo-Spin III”** ④ en un tubo nuevo + 600 μ L **“Pre Solution”** ⑥
centrifugar **(3min x 8.000 G)**



Una vez activado el filtro **“Zymo-Spin III”** ④ se transfiere los 50 μ l de ADN y centrifugar por **3 min x 16.000 G**

Extracción de ADN listo para análisis o conservación a -20 °C.

qPCR para microorganismos del filo Chloroflexota

Dilución de los primers

Se toma 5 μL del stock del primer 1223 R en 45 μL de agua MiliQ para un volumen final de 50 μL .

Se toma 5 μL del stock del primer 941F en 45 μL de agua MiliQ para un volumen final de 50 μL .

Para la reacción de PCR se utiliza el kit Quanti Nova SYBR Green PCR Kit (Qiagen)

Volumen final 20 μL para cada muestra:

Mix SYBR Green	10 μl	}	Master Mix
H ₂ O esterilizada	3,6 μl		15 μl + 5 μl de ADN = 20 μl
Primer 941F	0,7 μl		
Primer 1223R	<u>0,7 μl</u>		
	15 μl		

Para las muestras de ADN se hacen diluciones 1:10.

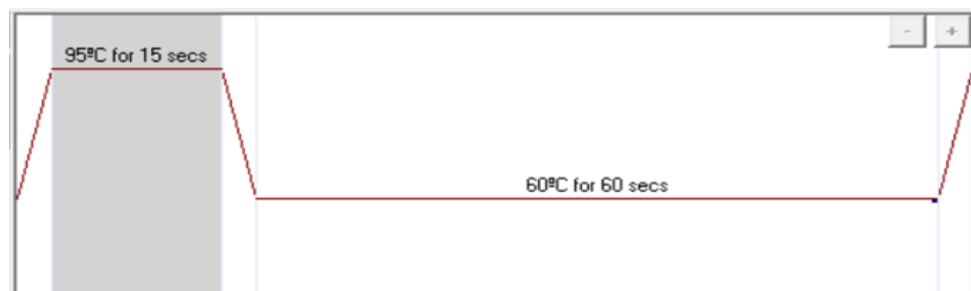
Tener en cuenta a la hora de hacer los cálculos de la cantidad de Master Mix los duplicados de las muestras, los puntos de la curva por duplicados, los NTC y una muestra más por error de pipeteo.

Total de muestras + 1 = volumen total de Master Mix.

Para el programa del Rotor Gene, se utiliza la siguiente rampa de temperaturas:

- Hold: 95°C por 2 minutos
- Ciclo:

95°C por 15 segundos	}	X 40 ciclos
60°C por 60 segundos		



Secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S

La secuenciación de amplicones del gen del ARNr de 16S se realiza con primers universales dirigidos a la región v3-v4 (341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) en la plataforma Illumina MiSeq del servicio de secuenciación de la empresa Macrogen, Inc.

Para cumplir con los requisitos del proyecto, se solicita una concentración de ADN superior a 0,1 ng/μl por muestra, que se evalúa mediante cuantificación de ADN utilizando el método de Picogreen. La preparación de la biblioteca se lleva a cabo mediante PCR con los primers antes mencionados, seguido de la adición de barcodes y adaptadores utilizando el kit de índices Nextera XT.

Se espera obtener 100.000 secuencias por muestra.

Análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva

Se determinará la calidad de las secuencias crudas mediante el programa FastQC v0.11.5.1. Se removerán adaptadores y secuencias de baja calidad mediante Trimmomatic v0.38, utilizando una calidad mínima de 25 (Bolger et al., 2014). Para el análisis de las secuencias resultantes de alta calidad se utilizará QIIME2 v2023.7 (Bolyen et al., 2019). El demultiplexado de las secuencias se realizará utilizando el plugin qiime cutadapt demux-paired. La remoción de secuencias quiméricas y generación de las amplicon sequence variants (ASVs) se realizará con DADA2 utilizando el plugin denoise-paired (vsearch v2.7.0).

La clasificación taxonómica se lleva a cabo utilizando la base de datos MiDAS 4.8.1 que es específica para sistemas de tratamiento de aguas residuales (Nierychlo et al., 2020). Los gráficos como barplots y heatmaps y los análisis multivariado serán obtenidos utilizando diferentes paquetes en RStudio (R versión 4.2.1).

