



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



**Integración de Secuenciación Masiva al
Monitoreo de Plantas de Tratamiento de
Aguas Residuales Domésticas para el estudio
de Comunidades Bacterianas y Genes de
Patogenicidad, con enfoque en la
interconexión Fisicoquímica, Bacteriológica y
Molecular.**



POSGRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Lic. Matias Pereiro

Orientadores:

Dra. Claudia Piccini

**Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
MEC**

Dr. José Sotelo Silveira

Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC

Dr. Javier García-Alonso

**Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario Regional del Este,
Universidad de la República**

Tabla de contenido

Tabla de contenido	3
Lista de tablas:	5
Lista de tablas anexos:	6
Lista de figuras:	7
Lista de abreviaturas:	10
Resumen:	11
Abstract:	13
1 Introducción:	15
1.1 Calidad de agua, contexto global y local.	15
1.2 Breve historia del desarrollo y funcionamiento del Saneamiento	17
1.3 Planta de tratamiento de lodos activados	20
1.4 Herramientas moleculares para monitoreo.	22
1.4.1 PCR en el estudio de aguas residuales	22
1.4.2 Genómica aplicada al estudio de microbiomas	23
1.4.3 Secuenciado masivo dirigido (target sequencing) a múltiples dianas: tecnología Ampliseq.....	24
1.5 Monitoreo bacteriológico.	28
1.6 Comunidades bacterianas en plantas de tratamiento.	30
2 Hipótesis de trabajo.	32
3 Objetivos.	32
3.1 Objetivo general: Evaluar comunidades bacterianas y genes de virulencia bacterianos en tres plantas de tratamiento de efluentes domésticos utilizando herramientas moleculares y analizar la interconexión con herramientas de monitoreo actuales.	32
3.2 Objetivos específicos.	32
4 Metodología	33
4.1 Plantas de tratamiento de efluentes estudiadas	33
4.2 Diseño de muestreo	37
4.3 Análisis fisicoquímicos y bacteriológicos	38
4.4 Extracción de ADN	38
4.5 PCR	39
4.6 Secuenciación gen ARNr 16S	40
4.7 Secuenciado masivo dirigido (target sequencing) a múltiples dianas	40

4.8	Análisis Bioinformático	41
4.9	Análisis de los datos	41
5	Resultados.....	43
5.1	Datos fisicoquímicos y bacteriológicos de rutina.....	43
5.2	Cantidad y calidad del ADN extraído	46
5.3	Amplificación del gen ARNr 16S por PCR.....	49
5.4	Curvas de rarefacción	50
5.5	Diversidad alfa.....	51
5.6	Diversidad Beta	54
5.7	Composición de la comunidad bacteriana.....	61
5.8	Evaluación del secuenciado masivo dirigido a múltiples dianas (Ampliseq).....	63
6	Discusión	68
6.1	Herramientas de monitoreo actuales y moleculares para la evaluación de plantas de tratamiento de aguas residuales.....	68
6.2	Caracterización de los cambios en la estructura comunitaria del agua residual en las plantas de tratamiento	71
6.3	Incidencia de los efluentes en los cauces receptores.....	75
6.4	Evaluación de las comunidades patogénicas.....	76
7	Consideraciones finales y perspectivas	78
8	Bibliografía	80
9	Anexos: Material adicional	92

Lista de tablas:

Tabla 1. Organismos patógenos y genes de patogenicidad (González, 2020).....	26
Tabla 2: Valores máximos permitidos para los parámetros exigidos en el decreto 253/79 para los efluentes vertidos a cursos de agua	29
Tabla 3 características generales de las plantas de tratamiento estudiadas	35
Tabla 4: Primers utilizados para la amplificación del gen ARNr 16S.....	39
Tabla 5: Datos fisicoquímicos de los afluentes y de los efluentes de las plantas de tratamiento. Las fechas mostradas son los días que se realizó el muestreo para el análisis genómico. Se puede observar las eficiencias de remoción de contaminantes de cada planta.	43
Tabla 6: Extracciones de ADN para el análisis del gen 16s y del secuenciado masivo dirigido a múltiples dianas. En la tabla se observa la calidad y cantidad de la extracción de ADN en cada punto con los dos métodos de extracción. La concentración de ADN fue medida por dos métodos diferentes, Nanodrop y Qubit.	47
Tabla 7: Pairwise ANOSIM, en esta tabla se puede observar los valores para las comparaciones de las diferentes comunidades en los puntos de muestreo. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se resaltan en negrita para los reactores con los afluentes y los reactores con los cauces aguas arriba y aguas abajo.	54
Tabla 8: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 20.5% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y las de los afluentes.	56
Tabla 9: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 10.3% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y las del cauce aguas arriba.	57
Tabla 10: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 9.2% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y del cauce aguas abajo	58

Lista de tablas anexos:

Tabla S 1. Tabla de análisis de diversidad de todos los puntos de muestreo. En esta tabla podemos observar por separado los valores de los diferentes índices de diversidad.	92
Tabla S 2. Datos Fisicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de José Pedro Varela. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista fisicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce.....	93
Tabla S 3. Datos Fisicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de Minas. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista fisicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce	94
Tabla S 4. Datos Fisicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de Treinta y Tres. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista fisicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce	95
Tabla S 5. Datos de NH₄ del efluente de Treinta y Tres	96
Tabla S 6: Datos de NO₃ del efluente de José Pedro Varela	98
Tabla S 7. Tabla de reads de los géneros de patógenos encontrados en la secuenciación del gen 16S. Aquí podemos observar la existencia de bacterias que tienen el potencial de tener los genes patogénicos buscados en la secuenciación masiva con el panel de Ampliseq.	99
Tabla S 8. Tabla de los ASVs en abundancia relativa con su taxonomía asignada por MIDAS de cada reactor de las tres plantas de tratamiento estudiadas.	100

Lista de figuras:

Figura 1. Escala visual porcentual de población sin saneamiento por departamento, Uruguay (Irigoín, 2018).....	17
Figura 2: Esquema del funcionamiento de planta de tratamiento de lodos activados con desinfección por UV.....	21
Figura 3: Esquema general de los pasos de amplificación y construcción de librerías de un Ampliseq. PCR multiplex, digestión enzimática y ligado de adaptadores con o sin barcodes.	25
Figura 4: Locación de las plantas de tratamiento de aguas residuales del este del país muestreadas. Minas, José Pedro Varela y Treinta y Tres.....	35
Figura 5: Imágenes satelitales de las plantas de tratamiento (ide.uy, 2023). A: Minas, B: Treinta y Tres y C: José Pedro Varela	36
Figura 6: Esquema de los puntos de muestreo de las plantas y los cauces receptores.	37
Figura 7: Datos del monitoreo de OSE del 2019 y 2020 de Escherichia Coli en los efluentes antes y después del UV, más el porcentaje de transmitancia de los efluentes para las plantas de A: José Pedro Varela, B: Treinta y Tres y C: Minas	45
Figura 8: Corrida de Bioanalyzer para los resultados de la PCR del gen de ARNr 16S de las primeras 10 muestras. En la flecha se muestra el producto de PCR buscado. Carril 0: marcador de peso molecular, Carril 1: Afluente Minas, Carril 2: Reactor 1 Minas, Carril 3: reactor 2 Minas, Carril 4: Efluente AUV Minas, Carril 5: Efluente DUV Minas, Carril 6: Aguas arriba Minas, Carril 7: Aguas Abajo Minas, Carril 8: Afluente JPV, Carril 9: Reactor JPV, Carril 10: Efluente AUV JPV, Carril 11 Efluente DUV JPV.	49
Figura 9: Curvas de rarefacción de la secuenciación del gen 16s para todas las muestras analizadas. A: Curva conjunta con todos los puntos de las tres plantas, en el eje Y se muestra la riqueza y en el eje X la profundidad del secuenciado. B: Curva de rarefacción para la planta de Treinta y Tres. C: Curva de rarefacción para la planta de José Pedro Varela, D: Curva de rarefacción de la planta de Minas.....	50
Figura 10: Riqueza de especies bacterianas en los diferentes puntos de las plantas. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente).....	52

Figura 11: diversidad alfa, índice de Shannon de los diferentes puntos de muestreo de las tres plantas de tratamiento. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente)...... 52

Figura 12: Diversidad alfa. Índice de Simpson de los diferentes puntos de muestreo. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente)...... 53

Figura 13: Equitatividad de Pielou de los diferentes puntos de muestreo. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente)...... 53

Figura 14: Análisis NMDS con el índice de similitud de Bray Curtis de los diferentes puntos de muestreo. En esta imagen se observa cómo se agrupan las comunidades de los diferentes puntos de muestreo en un sistema bidimensional. Aquí podemos ver la distancia significativa, según el ANOSIM, de los afluentes con los reactores y de los reactores con los cauces...... 55

Figura 15. Gráficas que muestran la abundancia relativa de los grupos bacterianos seleccionados que dan cuenta de la diferencia entre las comunidades. A: Afluentes vs. Reactores, B: Aguas Arriba vs. Reactores, C: Aguas Abajo vs. Reactores...... 59

Figura 16. Representación gráfica de los filos predominantes en abundancia relativa de los diferentes puntos de muestreo. Se muestran solo los filos con una abundancia relativa mayor al 5%, el resto de los filos se agrupan en el conjunto “other” 61

Figura 17. Análisis a nivel de género, o su nivel taxonómico más próximo, de los grupos predominantes en los diferentes puntos de muestreo. Aquí se muestra en abundancia relativa los géneros con mayor abundancia, los géneros con menor abundancia que 3% se agrupan en “otros”...... 62

Figura 18. Comparación de amplificación de muestras control positivas con muestras problema. Recuadro A: Amplificación de muestra positiva. B: amplificación de la muestra de los afluentes. C: amplificación de la muestra de los afluentes concentrada. 64

Figura 19. Pruebas efectuadas con la muestra control, con ADN positivo para patógenos utilizada en la tesis de González, 2020, y con el ADN obtenido de los efluentes de las plantas empleando diferentes ciclos de amplificación. Recuadro A: reacciones de PCR con 20 ciclos, a la izquierda muestras control positivo con picos del tamaño esperado; a la derecha se

observan las muestras de los efluentes sin picos (únicamente se visualizan los picos correspondientes al estándar). B: amplificaciones realizadas empleando 25 ciclos. A la izquierda se muestra el control positivo con picos correspondientes a amplicones de genes de virulencia y a la derecha el resultado de la amplificación en muestras de los efluentes (no se observa amplificación). C: amplificaciones realizadas empleando 35 ciclos. A la izquierda se observa la muestra control positivo y a la derecha los resultados obtenidos con las muestras provenientes de reactores, que carecen de picos del tamaño esperado..... 65

Figura 20. Análisis del control positivo mezclado en diferentes relaciones con la muestra de los efluentes. recuadro a, amplificación de la muestra control. Recuadro B: mezcla 1:1 de la muestra control con el pool de efluentes. recuadro C: mezcla 4:1 de la muestra control con el pool de efluentes. Se observa una disminución de fluorescencia de los picos de amplificación en los recuadros B y C..... 67

Lista de abreviaturas:

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Amplicón: Fragmento de ADN amplificado
- ANOSIM: Análisis no paramétrico de similitudes
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ARNr: ARN ribosomal
- ASVs: variante de secuencia del amplicón
- AUV: Antes de UV
- bp: Pares de Bases
- BSA: proteína albúmina sérica bovina
- ADNc: ADN complementario
- Cq: Cycle quantification
- CURE: Centro Universitario Región Este
- DBO5: Demanda biológica de Oxígeno
- SARS-CoV-2: en inglés, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
- DNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato
- DQO: Demanda Química de Oxígeno
- dsDNA: ADN de doble cadena
- DUV: Después de UV
- FastQC: Software para el control de calidad de los productos de secuenciación
- FU: del inglés, Unidades de Fluorescencia
- IIBCE: Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable
- MiDAS: del inglés, base de datos para microbios de lodos activados
- NGS: del inglés, secuenciación de nueva generación
- NK: Nitrógeno kjeldahl
- NMDS: Escalamiento multidimensional no paramétrico
- NMP: Número más probable
- OSE: Obras Sanitarias del Estado
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PGM: en referencia a plataforma de secuenciación Ion Torrent, del inglés Personal Genome Machine
- PT: Fósforo Total
- PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales
- qPCR: PCR cuantitativo en tiempo real
- Qubit: espectrofotómetro con fluorocromos específicos para medir ácidos nucleicos y proteínas
- SIMPER: análisis del porcentaje de similitud
- SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
- ssDNA: ADN de cadena simple
- taq: ADN polimerasa termoestable
- TBE: Buffer formado por Tris, borato y EDTA
- UFC: Unidad Formadora de Colonias
- UV: Ultravioleta

Resumen:

Hoy en día existe un gran desarrollo de herramientas moleculares con potencial aplicación en el monitoreo de comunidades bacterianas basadas en métodos de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS). El empleo de estas herramientas en aguas residuales aumentó en los últimos años debido a la importancia de las plantas de tratamiento para la vigilancia epidemiológica (ej. durante la pandemia de SARS-CoV-2). Se conoce que las comunidades microbianas entéricas y ambientales varían durante el tratamiento de las aguas residuales, pero la información sobre su dinámica durante el tratamiento, específicamente la de las comunidades patógenas, es escasa. En Uruguay, aproximadamente el 50% de la población está conectada a sistemas de saneamiento y las plantas de tratamiento que reciben estas aguas tienen diferentes eficiencias de remoción de contaminantes. La tecnología más utilizada en el país por su poder de remoción de contaminantes y desinfección son las plantas de lodos activados con desinfección por radiación Ultravioleta (UV). El objetivo de este trabajo fue conocer la variación de la estructura comunitaria bacteriana y establecer la eficiencia de remoción de patógenos en tres plantas de aguas residuales con tratamiento terciario de lodos activados y desinfección por UV de Uruguay. Para la evaluación de la estructura comunitaria de las plantas se utilizó una aproximación basada en secuenciación de amplicones del gen ribosomal bacteriano ARNr 16S (estudio de la comunidad bacteriana), mientras que para detectar la remoción de genes de patogenicidad se utilizó una secuenciación dirigida a blancos específicos con un panel Ampliseq (presencia de bacterias patógenas). Los resultados obtenidos muestran un funcionamiento similar en todas las plantas evaluadas, ya que las comunidades encontradas en los distintos pasos del tratamiento fueron similares. La estructura comunitaria bacteriana de los afluentes, dominada por bacterias anaerobias de la microbiota intestinal humana, tuvo como filo más representado a *Campylobacterota* y el género más abundante fue *Arcobacter*, un género específico del tracto digestivo. Al pasar a los reactores, la comunidad sufrió cambios significativos, siendo *Pseudomonadota* el filo más abundante y *Nitrosomonas* el género más representado. En los efluentes se mantiene el filo *Pseudomonadota* como predominante. Los cauces receptores de los efluentes muestran, tanto aguas arriba como aguas abajo, comunidades diferentes a las presentes en las plantas de tratamiento, con bacterias específicas de cuerpos de agua. Luego del vertido de los efluentes en los cauces receptores, se observa un aumento de la diversidad bacteriana, con un ingreso de grupos provenientes de las plantas. En los cauces, aguas arriba del efluente, el filo más representado fue *Bacteroidota*, mientras que aguas abajo fue el filo *Pseudomonadota*. Una vez caracterizadas las comunidades bacterianas de las plantas, se buscó la presencia de aquellos géneros conocidos como patogénicos. Para ello, se utilizó la aproximación de AmpliSeq, que permite evaluar a estas comunidades con alta especificidad y resolución a través de la detección de genes involucrados en la virulencia. Los datos obtenidos revelaron ausencia de genes de virulencia pertenecientes a las bacterias indicadoras buscadas. En conclusión, determinamos que las comunidades microbianas presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales sufren cambios en su estructura a medida que los

procesos de las plantas se desarrollan. En los afluentes observamos que existe una alta dominancia de un género de bacterias posibles patógenas emergentes no cultivables del género *Arcobacter*. De los efluentes podemos sugerir que su vertido en los cauces genera un impacto en la comunidad bacteriana de los mismos. La búsqueda de patógenos con el gen de ARNr 16S mostró baja cantidad de géneros con posibilidad de patogenicidad y la estrategia del panel de Ampliseq estudiadas no encontró ningún gen patogénico asociado para las muestras estudiadas. El poder de resolución de las herramientas moleculares permite diferenciar con mayor certeza el potencial peligro asociado a las muestras de aguas residuales. Esto, a su vez, permite mejorar su manejo. Un monitoreo rutinario de plantas de tratamiento puede ayudar a evaluar con mayor profundidad la peligrosidad de los efluentes.

Abstract:

Currently, there is significant development in molecular tools with potential applications in monitoring bacterial communities based on Next-Generation Sequencing (NGS) methods. The use of these tools in wastewater has increased in recent years due to the importance of treatment plants for epidemiological surveillance (e.g., during the SARS-CoV-2 pandemic). In wastewater, enteric and environmental microbiological communities vary depending on the treatment stages. Currently, there is limited information on microbial dynamics in activated sludge treatment plants, especially concerning pathogenic bacteria, throughout the entire process, from influent to receiving water bodies. In Uruguay, approximately 50% of the population is connected to sanitation systems, and the treatment plants receiving this wastewater vary in contaminant removal efficiency. The most used technology in the country, due to its contaminant removal and disinfection capabilities, is activated sludge treatment plants with UV disinfection. The objective of this study was to understand the variation in bacterial community structure and assess pathogen removal efficiency in three wastewater treatment plants with tertiary activated sludge treatment and UV disinfection in Uruguay. To achieve this, an approach based on 16S ribosomal bacterial gene amplicon sequencing (bacterial community study) and targeted sequencing with an AmpliSeq panel (presence of pathogenic bacteria) was employed. The results obtained show a similar operation in all evaluated plants, as the communities found in different treatment steps were like each other. The bacterial community structure in the influents is dominated by anaerobic bacteria from the intestinal microbiota, *Campylobacterota* is the most represented phylum, with *Arcobacter* being the most abundant genus. Upon entering the reactors, the community undergoes significant changes, with *Pseudomonadota* as the most abundant phylum and *Nitrosomonas* as the most represented genus, although in lower abundance than in the influents. In the effluents, *Pseudomonadota* remains predominant. The receiving water bodies of the effluents show different communities both upstream and downstream compared to those present in the treatment plants, with water body-specific bacteria. However, after the discharge of effluents into the receiving water bodies, an increase in bacterial diversity is observed due to the influx of groups from the plants that were not present upstream of the discharge. Upstream of the effluent discharge, the most represented phylum was *Bacteroidota*, while downstream, *Pseudomonadota* were the most abundant. Once the bacterial communities of the plants were characterized, they were analyzed to identify known pathogenic genera. However, the taxonomic resolution did not provide data on the present species. For this, the AmpliSeq approach was used, which allows for the evaluation of these communities with high specificity and resolution through the detection of genes involved in virulence. The obtained data revealed the absence of virulence genes belonging to the indicator bacteria sought.

In conclusion, we determined that the microbial communities present in wastewater treatment plants undergo changes in their structure as the plant processes develop. In the influents, we observed a high dominance of a genus of potentially emerging, non-cultivable pathogenic bacteria from the genus *Arcobacter*. From the effluents, we can suggest that their discharge into watercourses generates an impact on the bacterial community within them. The search for pathogens with the 16S rRNA gene showed a low number of genera with pathogenic potential, and the Ampliseq panel strategy studied did not find any associated pathogenic genes for the samples studied. The resolution power of molecular tools allows for a more accurate differentiation of the potential danger associated with wastewater samples, which in turn improves their management. Routine monitoring of treatment plants can help to more deeply assess the danger of effluents.

1 Introducción:

1.1 Calidad de agua, contexto global y local.

La importancia de la calidad del agua para las poblaciones humanas es conocida desde la antigüedad, sin embargo, en la actualidad aproximadamente 3 de cada 10 personas en todo el mundo (2.1 mil millones), no tienen acceso a agua segura o es de difícil disponibilidad en su hogar. Ocho de cada 10 personas que carecen de acceso a servicios básicos de abastecimiento de agua viven en zonas rurales. En cuanto a saneamiento, 6 de cada 10 (4.5 mil millones), carecen de saneamiento administrado de manera segura (WHO, UNICEF, 2021). Se estima que 673 millones de personas no tienen ningún tipo de retrete y practican la defecación al aire libre, y que casi 698 millones de niños en edad escolar carecen de servicios básicos de saneamiento en sus escuelas. Las consecuencias de un saneamiento deficiente son devastadoras para la salud pública y el desarrollo social y económico (OMS, UNICEF, 2020). Los sistemas de redes de saneamiento y Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), colectan, procesan y liberan al medio enormes cantidades de líquidos y lodos con potencial patogenicidad, dependiendo de los tipos de tratamiento que se apliquen. Los servicios de saneamiento gestionados de manera segura llegaron a un 62% de la población urbana mundial, pero solo a un 44% de la población rural. En África Subsahariana se registra el índice de progreso más lento del mundo. Solo un 54% de la población utiliza agua potable, y un 25% se encontraba en contextos frágiles (WHO, UNICEF, 2021). Además de esto, el cambio climático plantea serias amenazas para el agua potable y la salud. Los cambios a largo plazo en los patrones de temperatura y lluvia, y el aumento del nivel del mar representan cambios que pueden afectar la disponibilidad y calidad de los recursos hídricos. Las inundaciones, las sequías y huracanes plantean amenazas a corto plazo en forma de daños a la infraestructura y pérdida de servicios (Nijhawan, A. 2022). A nivel mundial, los brotes de enfermedades infecciosas después de un evento climático extremo se han atribuido comúnmente a suministros de agua potable contaminados y otros déficits en el suministro de agua y saneamiento (Nijhawan, A. 2022).

En el artículo Nº 47 de la constitución de la República Oriental del Uruguay se establece al saneamiento como un derecho humano universal (Uruguay, 1967). Todas las personas tienen derecho a gozar de servicios de saneamiento que garanticen la privacidad, la dignidad y la seguridad; y sean físicamente accesibles y asequibles. El saneamiento es también un bien público que reporta beneficios a toda la sociedad al mejorar la salud y promover el desarrollo económico y social (OMS, UNICEF 2020). La falta de un saneamiento seguro provoca enfermedades y dolencias que afectan de manera desproporcionada a los niños, como la diarrea, las infecciones parasitarias y el retraso del crecimiento (OMS, UNICEF 2020). Lograr el acceso universal a servicios de saneamiento seguros es costoso, pero no tomar medidas para hacerlo tiene un costo todavía mayor. Al invertir en saneamiento, se generan externalidades positivas en la sociedad. Se calcula que los beneficios económicos del saneamiento quintuplican los costos, lo que supone una relación costo-beneficio mejor que la del suministro de agua (OMS, UNICEF, 2020). En este marco, sólo en 2016, el agua, el saneamiento y la higiene

fueron responsables de 829.000 muertes por enfermedad diarreica y aproximadamente cada año 361.000 niños menores de 5 años mueren a causa de diarrea en todo el mundo (OMS, UNICEF, 2020). Se estima que entre 2030 y 2050 se producirán 48000 muertes adicionales por diarrea debido a los efectos del clima (Nijhawan, A. 2022). Estas enfermedades constituyen una preocupación importante de la salud pública a nivel mundial, no sólo por la morbilidad y la mortalidad que causan, sino por el alto costo que representa su prevención y tratamiento (Ramírez-Castillo et al., 2015). Se estima que las enfermedades transmitidas por el agua tienen un costo económico asociado de mil millones de dólares anuales solo en los Estados Unidos (Collier et al., 2012), mientras que, a nivel mundial, la pérdida económica ronda los 12 mil millones de dólares por año (Alhamlan, Al-Qahtani and Al-Ahdal, 2015).

La situación en Uruguay presenta dificultades en el área de saneamiento para cumplir con los objetivos de desarrollo sostenible para el año 2030. En cuanto al agua potable en Uruguay, según los datos de la ECH (Encuesta Continua de Hogares) procesados por CINAP (Consultora Investigación Aplicada), 0,6% de la población no tiene acceso a agua potable en la vivienda. Para estas personas, el acceso al agua es calificado como “básico” o “inseguro” porque “no existe instalación destinada a los servicios”. Esta cantidad ha disminuido constantemente desde 2012: ese año, 1,6% de la población uruguaya no tenía acceso al agua potable (Irigoin, 2018). 94,6% accede a agua segura, lo que significa que en ese caso los prestadores brindan condiciones de higiene a la población; 4,6% de la población accede a servicios de agua mejorada, es decir que el hogar gestiona la calidad del recurso (Irigoin, 2018). Las brechas en la cobertura de agua y saneamiento entre regiones y grupos poblacionales dentro de varios países de América Latina superan el 20 % o incluso el 30 %. Uruguay, aparece con la menor diferencia en el acceso al agua entre los sectores poblacionales rurales y urbanos y entre los más ricos y pobres de América Latina (WWAP, 2019).

Según Irigoin, 2018, 1.373.814 personas (37,1%) en Uruguay no tienen acceso a la red general de saneamiento (Figura 1). Son aproximadamente 460.000 hogares que se concentran en la zona rural del país y en localidades urbanas poco pobladas, pero también en Montevideo.

En la zona rural, el porcentaje de población sin saneamiento es 98,9%, un total de 192.446 personas. En las localidades urbanas con menos de 5.000 habitantes el porcentaje alcanza 72% y aun en Montevideo, donde la población cuenta con mayor conexión a la red de saneamiento, el porcentaje de población sin saneamiento es de 15%. En la capital las zonas sin saneamiento se concentran en la periferia y suelen ser las más pobres (Irigoin, 2018).

El contacto con agua contaminada con materia fecal humana puede generar parasitosis intestinales, denominados helmintiasis. *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris* son los parásitos más comunes en el país y afectan principalmente a niños (Cabrera, 2017). Las parasitosis impiden el crecimiento en su máximo potencial, repercuten en la capacidad de aprendizaje, pueden provocar anemia, diarrea, dolor abdominal y deterioro físico. A nivel general hay 1% de niños parasitados en el país, pero en los lugares donde viven estos niños, en condiciones de vulnerabilidad, con casas inhabitables, con contaminación, sin saneamiento y sin agua potable, la cifra puede llegar a elevarse a 60% de niños parasitados (Cabrera, 2017).



Figura 1. Escala visual porcentual de población sin saneamiento por departamento, Uruguay (Irigoin, 2018)

1.2 Breve historia del desarrollo y funcionamiento del Saneamiento

La importancia del saneamiento en la protección de la salud pública no fue entendida hasta mediados del siglo diecinueve. En la mayoría de las grandes ciudades las aguas residuales se vertían en las calles, en contacto con la población lo que tenía un gran impacto en la salud y en el ambiente (Lofrano & Brown, 2010).

Con la alta tasa de industrialización y urbanización en el siglo dieciocho, precediendo y acompañando la evolución industrial, se comprendió la importancia del saneamiento y el tratamiento de las aguas residuales (Metcalf & Eddy, 1998). El

desarrollo de la teoría microbiana de la enfermedad desarrollada por Koch y Pasteur a mediados del siglo diecinueve marcó un cambio de pensamiento en la salud pública (Koch, 1876, Pasteur, 1878). Hasta ese momento se había profundizado poco en la relación entre contaminación y enfermedades, y no se había aplicado hasta ese momento la bacteriología en el tratamiento de aguas residuales, disciplina entonces en sus inicios (Metcalf & Eddy, 1998). Inglaterra fue uno de los primeros países que empezó a experimentar con acciones organizadas para mejorar las condiciones ambientales en las ciudades. El principio que utilizaron fue asumir que la solución a la polución es la dilución (Lofrano & Brown, 2010). En Londres de 1858, se comenzó a construir una red de alcantarillado para la ciudad que finalizó en 1865. Con esto se removieron las aguas residuales de las calles y se canalizaron hacia el río Támesis. En esta época no se conocía la capacidad asimilativa de los cuerpos de agua, lo que produjo una gran contaminación en el río. Por esos años existen ejemplos de otras grandes ciudades de Europa que siguieron estos pasos (Lofrano & Brown, 2010).

Una de las primeras innovaciones en el tratamiento de aguas residuales fue la invención de los pozos negros en 1860 en Francia por L.H Mouras, que luego se patentaron con el nombre de tanques sépticos en 1895 por Donald Cameron. Los tanques sépticos al bajar la velocidad de las aguas residuales permiten la deposición en el fondo de los sólidos que con el tiempo son descompuestos mediante reacciones anaeróbicas. El problema de estos tanques es el desecho de los sólidos acumulados. Una solución creada para esto fue la creación de los tanques Imhoff en 1906 los cuales con su forma cónica tenían la posibilidad de bombear los barros depositados en el fondo (Sharma & Sanghi, 2012).

El siglo veinte fue testigo de una revolución en el manejo de las aguas residuales. Uno de los avances fue la presentación de la técnica de la Demanda Bioquímica de Oxígeno, que consiste en contabilizar el consumo microbiano de oxígeno de un efluente durante cinco días para obtener una medida de la materia orgánica biodegradable en el agua. Esto permite evaluar cómo será el impacto en los cursos de agua receptores. Con estas herramientas los estados comenzaron a legislar sobre la calidad de las aguas residuales, lo que estableció estándares de exigencias para los vertidos que rápidamente se reprodujo en varios países. Esto permitió mejorar las plantas de tratamiento con la creación y mejoramiento de tecnologías de remoción de contaminantes.

Si bien en el Siglo XX se dieron los mayores avances en el tratamiento de las aguas residuales, la idea de purificar estas aguas residuales con el uso de microorganismos data del siglo diecinueve cuando Edward Frankland estableció los principios fundamentales de filtración que llevó al desarrollo del concepto de los filtros percoladores, que desde 1895 hasta 1920 se instalaron varios en ciudades del Reino Unido (Lofrano & Brown, 2010). A la par de estos avances en el tratamiento del saneamiento, se dieron los primeros experimentos con aireación de aguas residuales pensado en remover contaminantes con el crecimiento bacteriano. Estos fueron hechos en Massachusetts, Estados Unidos, pero fueron perfeccionados y patentados en 1913 en el Reino Unido con el nombre de Lodos Activados por los ingenieros Edward Arden y W.T. Lockett (Lofrano & Brown, 2010). Esta forma de tratamiento de las aguas residuales es la más utilizada hasta el día de hoy.

Para entender los procesos de tratamiento que se dan en una planta de aguas residuales, éstos se pueden dividir en tratamiento Primario, Secundario y Terciario. El tratamiento primario contempla el uso de operaciones físicas tales como el uso de rejillas, la sedimentación y el desbaste, todo esto para la eliminación de los sólidos sedimentables y flotantes presentes en el agua. En el tratamiento secundario son procesos biológicos y químicos los que se emplean, con el fin de eliminar la mayor parte de la materia orgánica, mientras que en el terciario se emplean combinaciones adicionales de los procesos con el fin de eliminar otros compuestos, tales como el nitrógeno y fósforo, cuya reducción con el tratamiento secundario no es significativa (Metcalf & Eddy, 1998). El último proceso de una planta de tratamiento es la desinfección, la cual consiste en la destrucción o inactivación de los microorganismos contenidos en las aguas residuales. No todos los organismos se destruyen durante este proceso, esta es la principal diferencia entre la desinfección y la esterilización, proceso que conduce a la destrucción de la totalidad de los organismos. Lo que se busca con la desinfección es eliminar la suficiente cantidad de organismos patógenos para que el vertido no represente un riesgo sanitario (Metcalf & Eddy, 1998). En el campo de las aguas residuales las tres categorías de agentes biológicos entéricos de origen humano de mayores consecuencias para la salud pública son las bacterias, los virus y los quistes amebianos. Los métodos más empleados para llevar a cabo la desinfección son agentes químicos (e.g. Hipoclorito de sodio); agentes físicos (e.g. filtración); y radiación (i.e. UV) (Metcalf & Eddy, 1998). La radiación ultravioleta es un tipo de radiación empleada como desinfectante en plantas de tratamiento. La primera aplicación de UV en agua fue en 1910 para la desinfección de agua potable (Hijnen, 2006). Sin embargo, su uso generalizado se vio impedido debido a los altos costos de las lámparas y del mantenimiento, así como una baja confiabilidad de los equipos. Además, en esos tiempos se advirtió la llegada del cloro como un agente desinfectante más económico, más confiable y con el potencial de tener un efecto residual. Con el tiempo y gracias a la generación de conocimiento acerca de los subproductos peligrosos generados por la oxidación con cloro, la desinfección por radiación UV volvió a ser considerada como una opción viable y ambientalmente más amigable (Hijnen, 2006).

La inactivación de los microorganismos a través de UV se debe al daño causado a los ácidos nucleicos (ADN/ARN) de la célula o virus. El UV genera dímeros de pirimidinas y otros resultados inhibiendo la replicación del ADN y la transcripción de proteínas, esto no permite la multiplicación de las células (Hijnen, 2006). La longitud de onda óptima para una efectiva inactivación de los microorganismos es en el rango de 250 a 270 nm. La intensidad de la radiación disminuye a medida que nos alejamos de la fuente, las lámparas de baja presión emiten una luz monocromática a una longitud de onda de 254 nm, las lámparas de presión media son generalmente usadas en plantas de tratamiento con gran caudal ya que tienen de 15 a 20 veces más acción biocida que las lámparas de presión baja (EPA, 1999). Estas lámparas desinfectan más rápido y la radiación que emiten tiene mayor penetración, sin embargo, estas operan a mayor temperatura con un mayor consumo energético (EPA, 1999). La eficiencia de las lámparas depende de muchos factores, tales como la edad de las lámparas, la turbidez del agua, la concentración de sólidos suspendidos y de microorganismos. Por esto es recomendable

que, para el uso de la desinfección por UV el agua tenga una buena calidad fisicoquímica con una transmitancia mayor al 50% (Hassen, 2000).

La dosis aplicada de UV también afecta la eficiencia en la remoción de los microorganismos. La mínima dosis recomendada para agua es de 40 mW s cm^{-2} (WHO, 2003). Se sugiere en varios estudios que la dosis para matar patógenos es similar a la dosis para matar las bacterias indicadoras, pero también existe información que revela que cada microorganismo tiene diferente sensibilidad a diferentes dosis de UV, siendo uno de los más sensibles los coliformes fecales (Hassen, 2000). Una desventaja de la desinfección por UV es que, si la dosis no llega a ser letal, ciertas bacterias tienen la capacidad de reparar el daño realizado a su ADN y continuar proliferando (Hallmich, 2010).

1.3 Planta de tratamiento de lodos activados.

En este estudio trabajamos con tres plantas de tratamiento de aguas residuales que operan bajo el mismo principio basado en lodos activados (Fig. 2) y desinfección por UV. Este sistema se basa en desacoplar el tiempo de residencia hidráulico del tiempo de residencia celular mediante la recirculación de lodos desde el sedimentador secundario al reactor. La calidad del efluente de las plantas de tratamiento de lodos activados depende en gran medida de la eficiencia del proceso de separación sólido-líquido. Para una separación exitosa, los microorganismos deben formar flóculos que sedimenten y compacten bien sin dejar una alta concentración de sólidos suspendidos en el sobrenadante. Los flóculos de lodos activados que contienen concentraciones altas de sustancias poliméricas extracelulares (proteínas, compuestos húmicos y carbohidratos) son generalmente más fuertes, pero la morfología del flóculo también es importante para la estabilidad del mismo (Wilén, 2003). Un buen equilibrio entre bacterias filamentosas y formadoras de flóculos favorece la formación de flóculos grandes, densos y fuertes, deseables para una sedimentación y compactación adecuadas del lodo activado (Jenkins, 1993). En una planta de lodos activados típica el agua que ingresa a la planta pasa por un tratamiento primario de rejillas y desarenador para luego entrar al reactor donde se añade aire para fomentar el consumo de materia orgánica. En esta etapa se da el crecimiento de microorganismos generando los lodos activados. Luego de la aireación, el licor de mezcla, que es el agua residual más los lodos, pasa a un decantador donde los sólidos suspendidos sedimentan y se separan del agua tratada. Del lodo producido en el decantador, una parte se recircula al reactor de aireación para mantener una población microbiana activa y estable y otra parte se descarta (Mara and Pearson, 1998). El éxito del proceso de lodos activados depende de varios factores, además de la adecuada formación de flóculos para la sedimentación, anteriormente mencionado, también se incluye la carga orgánica, la relación entre C:N:P del agua residual entrante, la adecuada concentración de oxígeno en el reactor para una correcta oxidación de la materia orgánica y la edad del lodo para el control de una comunidad bacteriana viable (Henze, 2008). Un adecuado control de estos parámetros es esencial para asegurar un tratamiento eficaz y estable del agua residual. Uno de los parámetros de control más importantes e utilizados en lodos activados es el F/M (Food/

Microorganisms). Este es la relación entre la carga y la concentración de biomasa. Este parámetro es utilizado en la mayoría de las plantas para la operación de estas (Henze, 2008).

El principal problema que enfrentan estas plantas es la falta de sedimentabilidad de la biomasa, lo que normalmente se debe a un desequilibrio causado por un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas “bulking filamentoso” o un crecimiento disperso o “pin point floc” provocado por un crecimiento escaso de bacterias formadoras de flóculos. El bulking filamentoso promueve la formación de flóculos altamente irregulares que causan una disminución de la velocidad de sedimentación, así como una baja compactación del lodo, mientras que el crecimiento disperso conduce a la formación de flóculos pequeños y ligeros que no se sedimentan, lo que resulta en un efluente muy turbio con una alta concentración de materia suspendida (Jenkins, 1993). Estos episodios pueden disminuir la capacidad de tratamiento y causar problemas operativos en la planta.

Otro problema en plantas de lodos activados es la formación de espumas. Estas pueden ser causadas por factores como la presencia de detergentes, la agitación excesiva del reactor y la acumulación de microorganismos filamentosos (Li, 2016). Una causa común de la acumulación de lodos en una planta con un correcto control de la recirculación y purga de estos es la desestabilización de los procesos biológicos debido a cambios en las condiciones ambientales o en la calidad del agua entrante (Metcalf & Eddy, 1998).

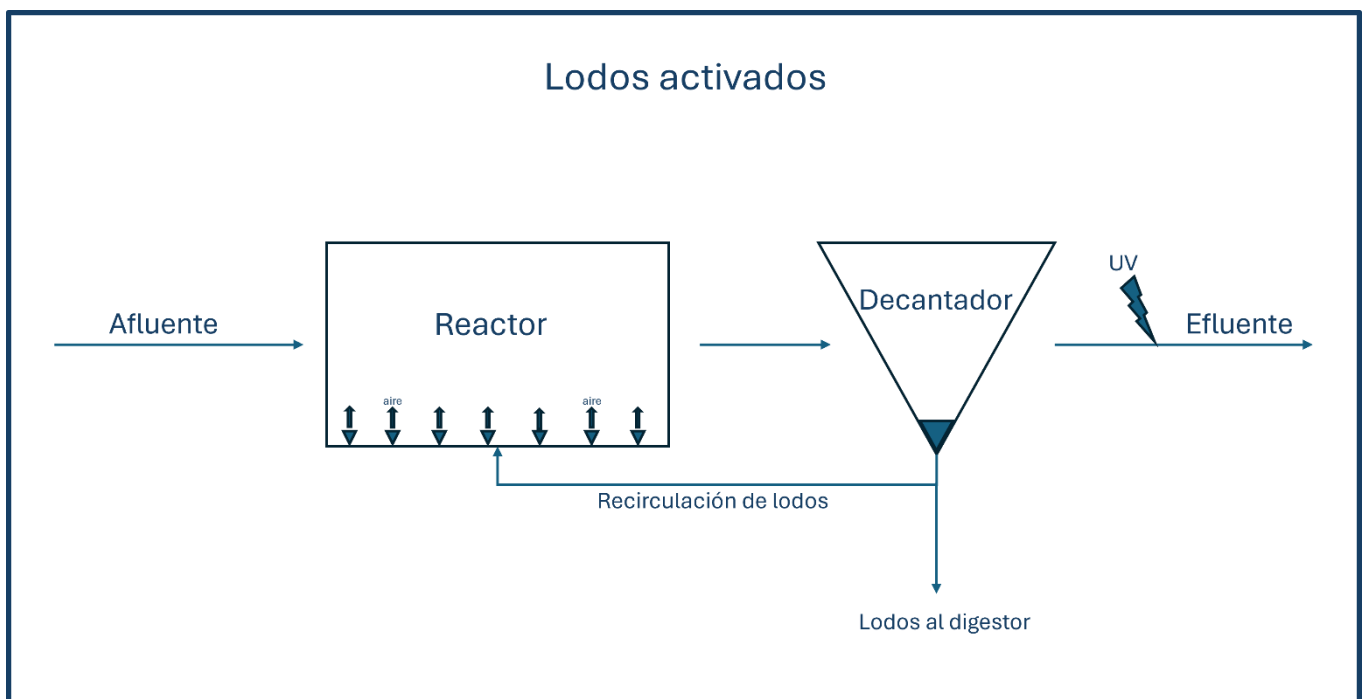


Figura 2: Esquema del funcionamiento de planta de tratamiento de lodos activados con desinfección por UV

1.4 Herramientas moleculares para monitoreo.

1.4.1 PCR en el estudio de aguas residuales

La identificación de microorganismos mediante métodos convencionales requiere el aislamiento de cultivos puros seguido de laboriosos experimentos de caracterización. Por lo tanto, estos procedimientos son inadecuados para el estudio de la biodiversidad de un ecosistema como el de las plantas de lodos activados. Además, la mayoría de los medios de cultivo tienden a favorecer el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos, mientras que otros que son importantes en la muestra original no crecen. Por lo tanto, en la actualidad se acepta generalmente que el número de especies procariotas conocidas es muy pequeño en comparación con la diversidad de microorganismos, lo que ilustra lo difícil que es obtener una imagen completa de la diversidad bacteriana de un ecosistema confiando únicamente en metodologías convencionales (Sanz, 2007). Una solución adecuada a este problema es utilizar enfoques de biología molecular. En este trabajo se utiliza una técnica basada en el ARN de la subunidad ribosomal pequeña (16S ARNr para procariotas), considerándolo como un "cronómetro evolutivo". Esta molécula fue elegida debido a su universalidad y abundancia en todos los seres vivos y al hecho de que es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución, aunque posee algunas regiones altamente variables. Estas características permiten la comparación de organismos dentro del mismo dominio, así como la diferenciación de cepas de la misma especie. Además, la secuencia génica es lo suficientemente larga como para generar datos estadísticamente relevantes y puede ser fácilmente secuenciada con la tecnología actual. Esto hace posible estudiar la biodiversidad de un hábitat natural de una manera relativamente simple, pero completa (Boon, 2001; Sanz, 2007). Para estudiar este gen debemos primero generar una cantidad suficiente de copias para poder secuenciarlo. Para ello utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

La PCR es un método que produce múltiples copias de un ADN objetivo. El método PCR utiliza una enzima polimerasa termoestable (por ejemplo, la enzima Taq) para crear múltiples copias del ADN (Sambrook, 1989). La detección del ADN, por ejemplo, en el genoma de un patógeno viral o bacteriano, se logra mediante el uso de secciones cortas de ADN sintético de cadena sencilla conocidas como cebadores de oligonucleótidos. Estos cebadores se pueden diseñar para ser específicos de un organismo individual o de un grupo de organismos (Giovannoni, 1991). La PCR funciona utilizando ciclos de diferentes temperaturas. El método más común emplea tres temperaturas distintas. El ADN de doble cadena se separa en hebras individuales mediante una temperatura alta, comúnmente superior a 90°C. Luego se utiliza una temperatura más baja para aparear los cebadores con la sección objetivo del ADN. Por último, a una temperatura intermedia entre las dos temperaturas anteriores, la enzima polimerasa produce una copia del ADN objetivo. Este ciclo de temperaturas se repite varias veces (Sambrook, 1989). En una PCR común se utilizan entre 25 a 35 ciclos, y debido a la naturaleza exponencial del método PCR, se pueden producir teóricamente más de 10^9 copias del ADN. Este gran número de ADN puede detectarse utilizando métodos como la electroforesis en gel de agarosa. La capacidad de la PCR para producir un número extremadamente grande de copias de

un segmento de ácido nucleico específico proporciona los requisitos para la detección rápida, muy sensible y específica de microorganismos deseados en una muestra ambiental (Sambrook, 1989).

Las PCR utilizadas en este trabajo fueron realizadas mediante un método estándar pero esta reacción se puede modificar para realizar las reacciones conocidas como PCR semi-anidado o anidado (Gajardo, 1995). Para esta PCR se realiza una segunda reacción de PCR utilizando cebadores adicionales, esto mejora la eficiencia de detección mediante la amplificación adicional del primer amplicón. Estos métodos modificados funcionan mediante el uso de uno o ambos, de los cebadores originales (semi-anidado) o mediante un conjunto completamente diferente de cebadores más selectivos (anidado). Ambos métodos han demostrado aumentar significativamente la eficiencia de detección (Gajardo, 1995).

Para la evaluación de la calidad del agua, los métodos de detección dirigidos a los ácidos nucleicos han ampliado nuestra visión del mundo microscópico más allá de la minoría de bacterias cultivables mediante métodos microbiológicos clásicos. La PCR permite la detección y amplificación altamente específica y sensible de genes en muestras ambientales (Vierheilig, 2016). Esto acoplado a una secuenciación, permite la investigación de diferentes comunidades, incluidos los virus y fagos.

1.4.2 Genómica aplicada al estudio de microbiomas

La metagenómica es el estudio de los genomas presentes en una muestra determinada. A diferencia de las técnicas tradicionales, que se centran en el cultivo de microorganismos individuales, la metagenómica permite la exploración directa del material genético en el medio ambiente sin la necesidad de cultivar organismos previamente. Esto ha llevado a una mejor comprensión de la diversidad y la función de las comunidades microbianas en diversos entornos, como el suelo, los océanos, el tracto gastrointestinal humano, etc. (Gilbert, 2010).

El estudio de los genomas se realiza construyendo librerías de ADN de las muestras para luego secuenciar el material genético. El primer tipo de secuenciación utilizado fue la secuenciación de Sanger. A pesar del alto grado de automatización, especialmente durante la secuenciación del genoma humano, este enfoque demostró que requiere mucho tiempo y es laborioso, especialmente en términos de preparación de muestras (Vierheilig, 2016). Estas limitaciones se hicieron particularmente evidentes en los estudios metagenómicos realizados con enfoques de Sanger (Venter, 2004). Estas dificultades enfocaron la investigación para el advenimiento de las plataformas de secuenciación de la siguiente generación, que comenzaron en 2005 con la introducción del secuenciador 454 GS 20, que revolucionó la secuenciación del ADN al permitir la secuenciación masiva con millones de reacciones que se ejecutan en el mismo experimento.

Desde sus inicios, los enfoques de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS) se han utilizado ampliamente para la investigación detallada del microbioma

humano, de los ecosistemas marinos o de los microbiomas ambientales en general (Malla, 2018). En estos estudios se utilizan principalmente dos enfoques principales, uno corresponde al estudio de la estructura de la comunidad microbiana en una muestra ambiental mediante secuenciación dirigida, es decir, la secuenciación de amplicones de PCR de un gen marcador (frecuentemente el gen ARNr 16S); y otro se enfoca en el análisis metagenómico del contenido completo de ADN de una muestra ambiental, denominados metagenómica *shotgun* (Tessler, 2017). El segundo enfoque permite realizar un estudio de la presencia de familias de genes con potencial metabólico distinto en una comunidad, para buscar, por ejemplo, ciertas vías metabólicas o proteínas específicas que puedan tener una aplicación biotecnológica o en medicina. Mientras que la secuenciación dirigida permite realizar un censo detallado de las comunidades microbianas (Vierheilig, 2016). La metagenómica *shotgun* implica la secuenciación de todo el material genético presente en una muestra, incluyendo el ADN de los microorganismos, así como el ADN de otros organismos presentes en la muestra, como plantas, animales y bacteriófagos (Tessler, 2017).

1.4.3 Secuenciado masivo dirigido (target sequencing) a múltiples dianas: tecnología Ampliseq

En este trabajo además de la secuenciación del gen ARNr 16S se utilizó otro acercamiento de secuenciación masiva dirigida llamado comercialmente “AmpliSeq” (Figura 3) esta es una técnica basada en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR multiplex. Esta técnica de amplificación de ADN permite detectar y amplificar múltiples secuencias de ADN en una sola reacción. A diferencia de la PCR convencional, donde solo se amplifica un fragmento de ADN específico, la PCR multiplex utiliza múltiples pares de cebadores diseñados para reconocer y amplificar diferentes secuencias de ADN simultáneamente (Elnifro, 2000). Con esta secuenciación dirigida, se pueden secuenciar desde unos pocos a cientos de genes a una fracción del precio y de tiempo que llevaría un análisis de secuenciación dirigida de cada gen (Plitnick, 2021). El proceso se divide en varias etapas. En primer lugar, se seleccionan las regiones del genoma que se desean secuenciar. De esta selección se hace el diseño de una biblioteca de oligonucleótidos específicos para cada región, teniendo en cuenta la viabilidad de la reacción con todos los cebadores en el tubo, esta biblioteca va a permitir la amplificación específica de estas regiones. Luego, se realiza la amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una vez amplificadas, estas regiones de interés se purifican y se unen a adaptadores específicos para la secuenciación en NGS (Li, 2015). Estos adaptadores actúan como "etiquetas" para cada fragmento amplificado, lo que permite la identificación y el análisis de los datos de secuenciación en la etapa posterior de análisis de datos. La biblioteca se carga en un secuenciador y una vez completada la secuenciación, los datos se procesan utilizando software bioinformático para identificar si se encuentran las secuencias buscadas y las variantes o mutaciones en las regiones de interés (Li, 2015).

Los genes que se utilizaron para crear la biblioteca de cebadores están representados en la Tabla 1. En la misma se muestran, los genes de interés y las bacterias asociadas a esos genes, el panel utilizado está diseñado con cebadores para la búsqueda de hasta 72 genes de virulencia (González, 2020).

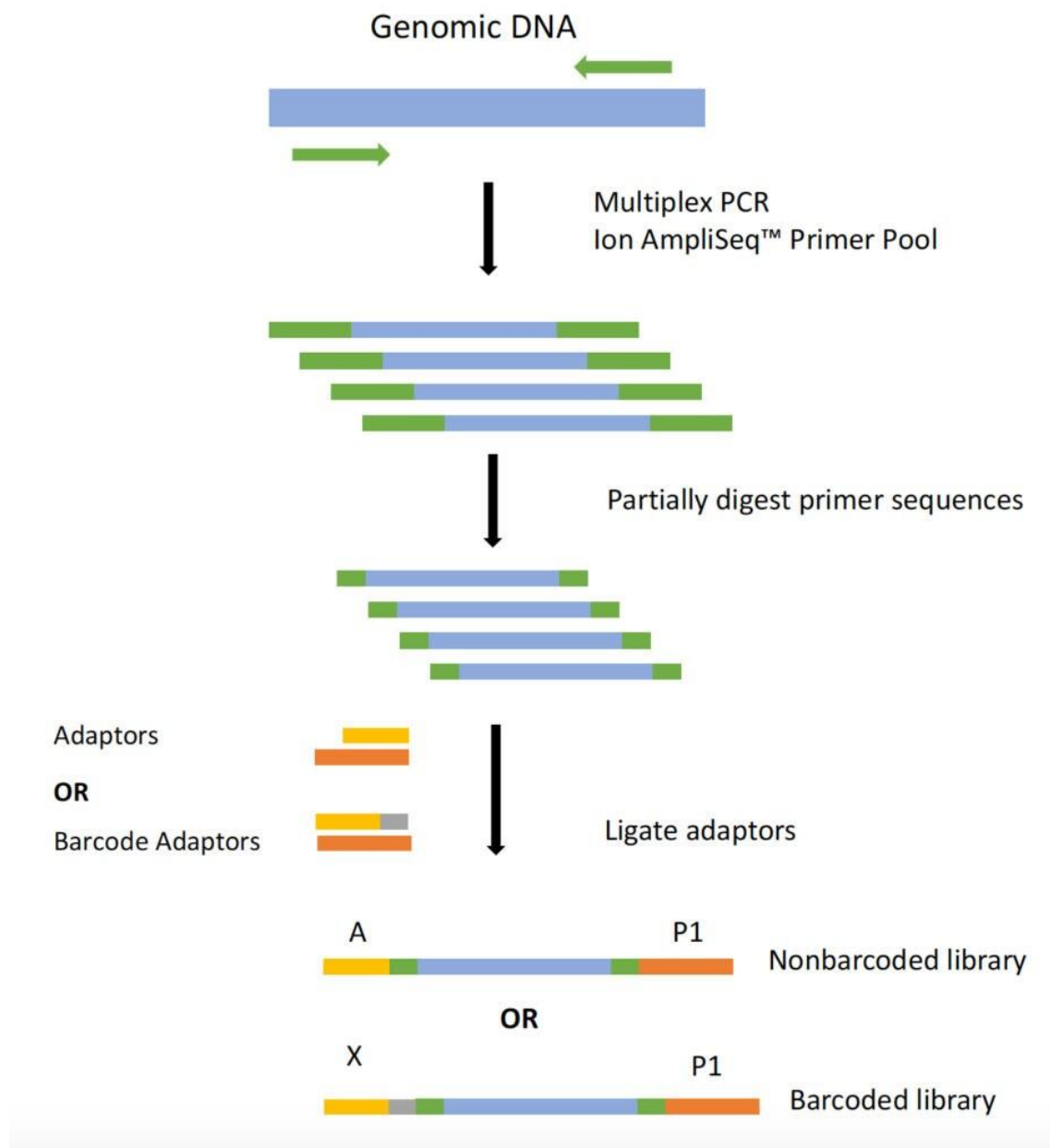


Figura 3: Esquema general de los pasos de amplificación y construcción de librerías de un AmpliSeq. PCR multiplex, digestión enzimática y ligado de adaptadores con o sin barcodes.

Tabla 1. Organismos patógenos y genes de patogenicidad (González, 2020).

Phylum/Clase	Orden	Géneros / Especies	Factor de Virulencia	Nº de genes seleccionados	gen blanco
Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i>	Complejo Antígeno 85	3	<i>fbpA, fbpB, fbpC</i>
			Antígeno P27 (Lipoproteína LprG)	1	<i>lprG</i>
Proteobacteria Gammaproteobacteria	Aeromonadales	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>Aeromonas spp.</i>	Complejo Enterotoxina citotóxica termolábil /Aerolisina/ hemolisina	3	<i>aerA (act/hlyA/aer)</i>
			Enterotoxina Citotónica Termolábil	1	<i>alt</i>
			Enterotoxina Citotónica Termoestable	1	<i>ast</i>
			Elastasa	1	<i>ela</i>
			Fosfolipasa C	1	<i>plc</i>
Proteobacteria Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	Pili tipo IV	2	<i>bfpA, bfpB</i>
			Intimina	1	<i>eaeA</i>
			Enterotoxina termolábil	2	<i>eltA, eltB</i>
			Enterotoxina termoestable	2	<i>est1, est2</i>
			Fimbrias F17 y F41	2	<i>f17A, f41A</i>
		<i>Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Shigella sonnei y Shigella flexneri</i>	Toxina tipo Shiga I y II	4	<i>stx1A, stx1B, stx2A, stx2B</i>
		<i>Salmonella spp.</i>	Invasina A	1	<i>invA</i>
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	Adhesina yad	1	<i>yadA</i>
		<i>Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica y Yersinia pseudotuberculosis</i>	Tirosin-Fosfatasa	1	<i>yopH</i>
	Pasteurelales	<i>Pasteurella multocida</i>	Toxina dermonecrótica	1	<i>toxA</i>
	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exotoxina A	1	<i>exotA</i>
			Exoenzima S	1	<i>exoS</i>
			Exoenzima U	1	<i>exoU</i>
	Vibrionales	<i>Vibrio cholerae, Vibrio spp.</i>	Toxina Colérica	2	<i>ctxA, ctxB</i>
proteobacteria Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	<i>Helicobacter pylori</i>	Ureasa	3	<i>ureA, ureB, ureI</i>
			Citotoxina vacuolizante	1	<i>vacA</i>

Tabla 1 continuación. Organismos patógenos y genes de patogenicidad (González, 2020).

Phylum/Clase	Orden	Géneros / Especies	Factor de Virulencia	N° de genes seleccionados	gen blanco
Firmicutes Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus anthracis</i>	Capsula	3	<i>capA, capB, capC</i>
			Toxina antrácica: antígeno protector (AP), factor letal (FL) y factor de edema (FE)	3	<i>pag, lef, cya</i>
		<i>Bacillus cereus</i>	Toxina emética	4	<i>cesA, cesB, cesC, cesD</i>
			Citotoxina K	1	<i>cytK</i>
			Toxina hemolítica	3	<i>hblA, hblC, hblD</i>
			Enterotoxina no hemolítica	3	<i>nheA, nheB, nheC</i>
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Internalina A	1	<i>inlA</i>
			Listeriolisina O	1	<i>hlyA</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulasa	1	<i>coa</i>
			Proteína A de unión a fibronectina	1	<i>fnbA</i>
			Toxina de shock séptico (TSST)	1	<i>tst</i>
	Lactobacillales	<i>Enterococcus faecalis</i>	Proteína de unión al colágeno (adhesina)	1	<i>ace</i>
		<i>Enterococcus faecium</i>	Proteína de unión al colágeno (adhesina)	1	<i>acm</i>
			Hialuronidasa	1	<i>hyl</i>
			Pili	1	<i>pilB</i>

1.5 Monitoreo bacteriológico.

Históricamente la forma aceptada por normativa para evaluar la calidad microbiológica de las aguas es el monitoreo de concentraciones de bacterias indicadoras, como pueden ser los Coliformes totales, Coliformes fecales, *Escherichia coli* y Enterococos. Estos microorganismos están vinculados con la materia fecal de humanos y otros animales, y su presencia en aguas se utiliza para indicar peligro asociado a patógenos entéricos que pueden generar enfermedades en personas expuestas (Satoshi & Sadowsky, 2008). En el país existe normativa para la regulación de los cauces de agua según sus usos y de los efluentes de las plantas de tratamiento según donde vierten sus aguas. El decreto 253/79 contiene los valores máximos permitidos y los parámetros a monitorear para los efluentes de las plantas (Tabla 2). El parámetro microbiológico presente en la normativa para efluentes que vierten directamente a cursos de agua son los coliformes fecales con un valor máximo permitido de 5000 UFC/100ml. Los marcadores bacteriológicos como coliformes fecales son utilizados como control de desinfección desde hace ya más de un siglo (Ashbolt, 2001). El uso de estos indicadores está muy extendido debido a que el cultivo de bacterias patógenas es una tarea riesgosa y laboriosa, la cual incluye el enriquecimiento y el crecimiento en medios selectivos con el objetivo de separar uno o un conjunto de cepas o especies específicas del contexto bacteriano existente en la muestra (Oliver, 2010). Esto tiene sus limitaciones ya que en algunos casos las concentraciones son muy pequeñas como para lograr un cultivo, pero suficientes para causar infección y, por otro lado, muchas bacterias, incluyendo importantes patógenos humanos, responden al estrés ambiental generando formas viables, pero no cultivables (Oliver, 2010). Además de estas dificultades, en la actualidad existen varios estudios que ponen en duda la efectividad como indicadores de estos microorganismos, ya que en diversos casos pueden sobrevivir y reproducirse en el ambiente (Satoshi & Sadowsky, 2008). Por esta razón creemos que en el presente existe la necesidad de aplicar herramientas sensibles y precisas que garanticen la detección de patógenos bacterianos y sus capacidades patogénicas o tóxicas. Los avances y la intensificación del uso de los métodos de secuenciación de nueva generación, que permiten el análisis masivo de ácidos nucleicos ambientales, abren una gama de oportunidades para el desarrollo de nuevas formas de monitorear la calidad del agua.

Tabla 2: Valores máximos permitidos para los parámetros exigidos en el decreto 253/79 para los efluentes vertidos a cursos de agua

Parámetro	Estándar
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
Detergentes	Máx. 4 mg/L en LAS
Sustancias Fenólicas	Máx. 0,5 mg/L en C6H5OH
Caudal	El caudal máximo en cualquier instante no podrá exceder al caudal medio del período de actividad
Amoniaco	Máx. 5 mg/L en N
Fósforo total	Máx. 5 mg/L en P
Coliformes Fecales	Máx. 5000 CF 100ml
Cianuro	Máx. 1 mg/L
Arsénico	Máx. 0,5 mg/L
Cadmio	Máx. 0,05 mg/L
Cobre	Máx. 1 mg/L
Cromo	Máx. 1 mg/L
Mercurio	Máx. 0,005 mg/L
Níquel	Máx. 2 mg/L
Plomo	Máx. 0,3 mg/L
Zinc	Máx. 0,3 mg/L

1.6 Comunidades bacterianas en plantas de tratamiento.

Las comunidades bacterianas en las plantas de tratamientos son las encargadas de la remoción de nutrientes, estabilización del lodo, formación de los flóculos y brindar las condiciones adecuadas para la sedimentación. La variabilidad de las comunidades de organismos en plantas de aguas residuales es considerable, inclusive siendo plantas con similar tratamiento (Kwiatkowska, 2016). A su vez, es esperable encontrar cambios en diferentes estadios del proceso (Qin, 2019). La diversidad en las comunidades microbianas de las plantas de aguas residuales domésticas puede variar debido a factores como variaciones en la composición inicial del agua residual (afluente), cambios en la composición de nutrientes, o por la entrada de compuestos químicos tóxicos que pueden hacer variar drásticamente la estructura de la comunidad (Qin, 2019). Los cambios de las condiciones de oxigenación o de recirculación de lodos en los reactores también puede ser otro factor considerable en la variabilidad de las comunidades (Ofiteru, 2010). Otra causa de cambios puede ser la competencia microbiana, o la dispersión por eventos al azar de colonización o extinción (Nielsen, 2010; Heck, 2023). Existen estudios de comunidades microbianas en plantas de tratamiento de lodos activados de aguas residuales domésticas que nos permiten evidenciar que los filos más abundantes son *Pseudomonadota* (ex *Proteobacterias*), *Bacteroidota*, *Acidobacteria*, *Chloroflexota*, *Plantomycetota* y *Nitrospirota* (Yang, 2020; Qin, 2019; Johnston, 2020). Dentro de estos filos las *Pseudomonadota* son el filo mayoritario de la comunidad microbiana. La clase *Betaproteobacteria* es la que cuenta con la mayor representación y es la responsable de la mayor parte de la remoción orgánica y de nutrientes de las aguas residuales (Qin, 2019).

Los géneros más presentes en los reactores de lodos activados son *Tetrasphaera*, *Trichococcus*, *Microthrix*, *Rhodoferax*, *Rhodobacter*, *Ferruginibacter*, *Sarcinathrix*, *Acidovorax*, *Nitrospira*, *Hyphomicrobium*, *Acinetobacter*, *Prevotella* (McIlroy, 2015; Shchegolkova, 2016; Yang, 2020).

Un grupo de bacterias importante para el funcionamiento de las plantas son las bacterias filamentosas, estas pertenecen a diversos grupos taxonómicos. Las más representadas en plantas de tratamiento son las *Nostocola limicola* I y II, *Mycobacterium Fortuitum* y *Microthrix parvicella* (Guo, 2012; Mielczarek, 2012). En condiciones normales de funcionamiento, participan de la degradación de la materia orgánica, en la eliminación del nitrógeno y en la formación de los flóculos de los reactores (Bovio-Winkler, 2023). En ocasiones algunas de estas bacterias según las condiciones ambientales pueden generar fenómenos de *bulking* donde aumentan dando episodios donde se pierde o modifica la sedimentabilidad de los lodos generando problemas en la operación de las plantas (Qin, 2019). Algunas de las bacterias más estudiadas en episodios de *bulking* son *Microthrix parvicella* y *Thiothrix spp* (Mielczarek, 2012).

Los organismos patógenos pueden sobrevivir en las plantas de tratamiento, pero se observa en estudios como la comunidad varía su representación dentro de las plantas. En los afluentes tiene su mayor representación con niveles de hasta el 55% de la comunidad para luego bajar a niveles del 1% en los reactores de las plantas de tratamiento (Lu, 2015). Existen diversos estudios en los últimos años que utilizan análisis

metagenómicos para evaluar la diversidad y la abundancia relativa de los patógenos en diferentes plantas residuales. Se han secuenciado hasta 29 géneros asociados a patógenos y los más prevalentes en las plantas son *Arcobacter* y *Aeromonas*. Dentro de estos las especies con mayor abundancia fueron *A. butzleri*, *A. hydrophilla*, *E. coli*, *K. pneumoniae* (Lu, 2015). Estos estudios moleculares han aumentado el conocimiento de las comunidades y de la diversidad de bacterias en las plantas de tratamiento, incluso demostrando que especies antes no contempladas por métodos clásicos, representan gran abundancia relativa dentro de la comunidad de patógenos (Lu, 2015, Kwiatkowska, 2016, Qin, 2019).

En el país existen trabajos que estudian aguas residuales. Podemos encontrar el de Griffero, 2019 donde estudian, en arroyos impactados por aguas residuales, la presencia de contaminantes emergentes. En este estudio encontraron, aguas abajo de las áreas urbanas, presencia de productos farmacéuticos, hormonas, drogas de abuso y productos relacionados con el estilo de vida. La presencia de pesticidas fue mayor en lagunas y arroyos de las cuencas estudiadas asociado a la actividad agrícola cercana. Por otro lado, existen grupos que estudian las aguas impactadas por efluentes en playas, estos estudios muestran la presencia de genes de resistencia a antibióticos y genes de virulencia (Fresia, 2019). Para plantas de tratamiento con afluentes agroindustriales existen varios artículos que estudian las comunidades de estas plantas (Bovio-Winkler, 2020, Bovio-Winkler, 2023) y posibles desarrollos biotecnológicos en estos reactores (Fuess, 2022).

2 Hipótesis de trabajo.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas, con lodos activados y desinfección por UV, alteran la estructura comunitaria bacteriana del agua residual durante el tratamiento y disminuyen la contaminación de microorganismos patógenos y por ende los genes patogénicos en los efluentes. La secuenciación dirigida aplicada a estas plantas puede permitir mejorar el manejo del sistema. El monitoreo de las comunidades ambientales y de bacterias nocivas a través de herramientas basadas en secuenciación masiva se puede acoplar a los métodos existentes para generar alertas sobre el funcionamiento de las plantas, mejorando su performance y disminuyendo el riesgo sanitario potencial de los efluentes.

3 Objetivos.

3.1 Objetivo general: Evaluar comunidades bacterianas y genes de virulencia bacterianos en tres plantas de tratamiento de efluentes domésticos utilizando herramientas moleculares y analizar la interconexión con herramientas de monitoreo actuales.

3.2 Objetivos específicos.

- 1) Realizar la secuenciación del gen ARNr 16S para estudiar las comunidades microbianas en los puntos de tratamiento y utilizar estos datos para comparar resultados con la metodología de AmpliSeq.
- 2) Establecer si existe una remoción de patógenos bacterianos en los efluentes de las plantas de tratamiento, utilizando la herramienta Ampliseq con un panel que evalúa la presencia de genes de virulencia bacterianos que están asociados a bacterias patógenas conocidas.

4 Metodología

4.1 Plantas de tratamiento de efluentes estudiadas

Todas las plantas estudiadas trabajan con aguas residuales domésticas. Estas plantas utilizan reactores de lodos activados para la remoción de nutrientes. Las plantas se encuentran en la región sureste del país y dos de las plantas están localizadas en capitales departamentales, Minas y Treinta y Tres, la última está localizada al norte de Lavalleja en la localidad de José Pedro Varela (Figura 4). Las características generales de las plantas se encuentran en la tabla 3. Estas plantas fueron seleccionadas debido a que las mismas cuentan un sistema de tratamiento similar de lodos activados con nitrificación/desnitrificación y desinfección por UV. La planta de Minas tiene un pretratamiento a la entrada de la planta con un filtro de rejillas y un desarenador (Figura 5A), luego de esto tiene el tratamiento secundario con el proceso central de los lodos activados. En el reactor se biodegrada la materia orgánica a través de una comunidad biológica, para la oxidación de la materia se ingresa aire por sopladores en el fondo de los reactores (Figura 5A). En esta etapa se produce la nitrificación del agua residual donde los microorganismos oxidan el amonio del agua en nitrito y luego nitrato. Luego de esta etapa se pasa a la etapa de desnitrificación donde el agua es recirculada a un reactor de cabecera donde el agua residual nitrificada se mezcla con el agua residual entrante en condiciones anóxicas para favorecer el proceso desnitrificación, en este proceso los microorganismos convierten los nitratos en nitrógeno gaseoso (Figura 6A). Luego de esto tenemos la etapa de clarificación en donde se da la separación de los lodos del agua tratada. En estos tanques de sedimentación los lodos se asientan en el fondo y el agua clarificada sale por la parte superior (Figura 6A). En esta etapa tenemos la dosificación de cloruro férrico para precipitar los fosfatos del agua residual, esta es la única planta de las estudiadas que tiene este sistema para eliminar estos nutrientes. Por último, el agua clarificada pasa por una etapa de desinfección por UV antes de ser vertida a el curso de agua receptor (Figura 6A). En la etapa de clarificación se regula el manejo de los lodos, parte de los lodos asentados son recirculados al reactor aerobio para mantener una concentración adecuada de microorganismos para la oxidación y parte de estos lodos se recirculan a un digestor de lodos (Figura 6A). En esta etapa tenemos el espesamiento de los lodos con el objetivo de reducir el volumen de los lodos con la eliminación de agua, luego de esto se da la estabilización del lodo en el digestor con una digestión anaerobia, esto se realiza con el objetivo de reducir la materia orgánica de los lodos, los patógenos y minimizar los malos olores. Por último, se da la deshidratación de los lodos para eliminar el agua intersticial y reducir aún más su volumen y peso. Para ello se utiliza un filtro de banda que por un método de presión separa el agua de los lodos. La disposición final de los lodos es a un relleno sanitario. La planta de Treinta y Tres tiene un diseño similar en donde a la entrada del agua residual existe un pretratamiento de rejillas y desarenador (Figura 5B), luego de esto tenemos el tratamiento secundario de lodos activados que se da en el reactor aerobio con la biodegradación de la materia orgánica y con la oxidación del amonio en nitrato, en este reactor al igual que en el de Minas el ingreso de aire se da por sopladores que se

encuentran en el fondo de este (Figura 5B). Posteriormente tenemos la recirculación del agua nitrificada al reactor anóxico de cabecera donde el agua residual tratada rica en nitratos se mezcla con el agua residual cruda en condiciones anóxicas para favorecer el proceso de desnitrificación. A continuación, el agua tratada pasa a los clarificadores donde los lodos se asientan en el fondo y el agua residual clarificada sale por la parte superior. Esta agua clarificada tiene un tratamiento de desinfección por UV antes de ser vertida al cauce receptor (Figura 6B). La diferencia entre estas plantas reside en el tiempo de retención del agua residual y de sólidos en los reactores. En una planta de lodos activados clásica como la de Minas, el tiempo de retención del agua residual se diseña entre 4 a 8 horas y en una planta de lodos activados de aireación extendida el tiempo es de 18 a 36 horas, esto permite una mayor remoción de materia orgánica y una mejor nitrificación. El tiempo de retención para los sólidos en una planta de lodos activados común como la de Minas se diseña para 7 a 9 días mientras que para plantas de aireación extendida los tiempos de residencia son de hasta 25 días. Esto permite la estabilización de los lodos bajando el contenido de materia orgánica del lodo en hasta un 50% (OSE, 2012) esto reduce la cantidad de lodos y facilita su manejo, además debido a esta estabilización no es necesario incorporar un digestor de lodos en la planta minimizando el tratamiento de lodos y generando un proceso operativo más simple. En Treinta tres el tratamiento de lodos se realiza recirculando el lodo sedimentado en el clarificador al espesador de lodos y luego al filtro de banda para eliminar el agua para así poder llevar a su disposición final un relleno sanitario. Podemos observar en la figura 5B como la planta de Treinta y Tres no cuenta con digestores anaerobios para los lodos, en cambio sí se pueden observar en la planta de Minas (Figura 5A).

Por último, tenemos la planta de José Pedro Varela (Figura 5C) Esta planta es de lodos activados con aireación extendida como Treinta y Tres, pero presenta aireación mecánica para la oxidación de la materia orgánica. Tiene como las anteriores plantas en la entrada un pretratamiento con rejas y un desarenador (Figura 5C), luego el tratamiento secundario de lodos activados donde se realiza la biodegradación y nitrificación de la materia orgánica. En este caso el reactor está diseñado como una zanja carrusel en donde el líquido se mantiene en movimiento por la acción de aireadores mecánicos horizontales que oxigenan el líquido para la remoción aerobia de la materia orgánica (figura 5C). Posteriormente el agua tratada se recircula a un reactor anóxico que se observa en la figura 6C donde se mezcla el agua residual cruda con la tratada y se da las condiciones necesarias para la desnitrificación. En la siguiente etapa tenemos la clarificación del agua residual en los sedimentadores donde los lodos se asientan en el fondo y el agua clarificada sale por la superficie (Figura 6C). Por último, tenemos un tratamiento de desinfección por UV para luego ser vertido el efluente en el cauce receptor. El tratamiento de los lodos en esta planta se realiza recirculando lodos del sedimentador hacia el espesador de lodos para luego ser colocados en el lecho de secado (Figura 5C) hasta su deshidratación para luego ser llevados a un relleno sanitario.



Figura 4: Locación de las plantas de tratamiento de aguas residuales del este del país muestreadas. Minas, José Pedro Varela y Treinta y Tres.

Tabla 3 características generales de las plantas de tratamiento estudiadas

	Población	Cobertura de saneamiento %	Caudal promedio (m3/día)	Tipo de planta	Remoción Nitrógeno	Remoción de Fósforo	Desinfección
Minas	38446	59	3500	lodos activados	reactor anóxico de cabecera	si, aplicación de cloruro férrico	UV
Treinta y tres	25477	74	4800	lodos activados con aireación extendida	reactor anóxico de cabecera	no	UV
José Pedro Varela	5118	56	1400	lodos activados con aireación extendida	reactor anóxico de cabecera	no	UV

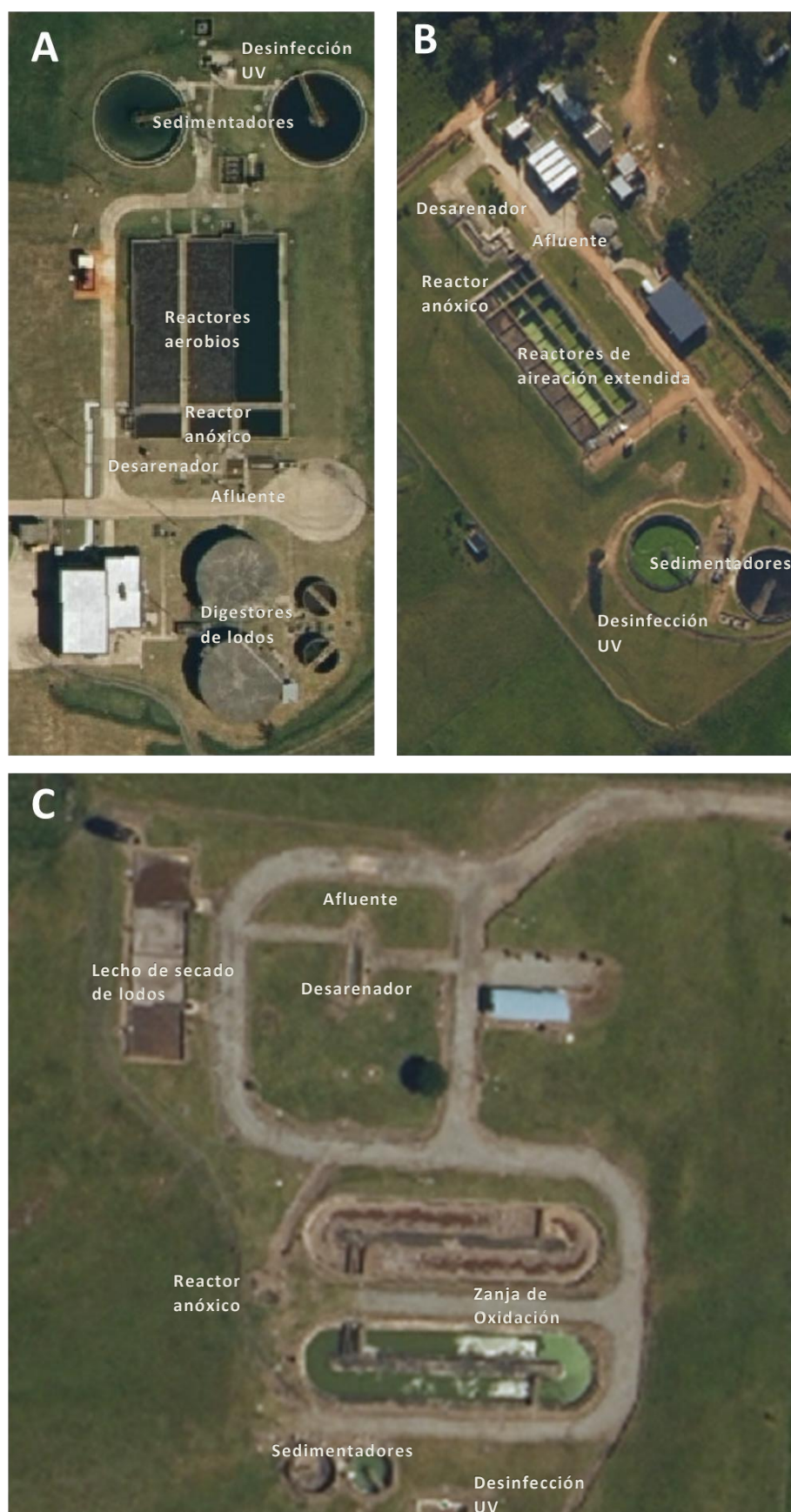


Figura 5: Imágenes satelitales de las plantas de tratamiento (ide.uy, 2023). A: Minas, B: Treinta y Tres y C: José Pedro Varela

4.2 Diseño de muestreo

Se tomaron muestras de todo el proceso (Figura 7) según el plan de monitoreo de OSE para cada planta, esto nos permite luego poder comparar datos históricos bacteriológicos y fisicoquímicos con los datos moleculares. Las muestras se colectaron en frascos de vidrio ámbar esterilizados según protocolo de OSE y fueron transportadas en conservadoras a 4 °C hasta el laboratorio en menos de 6 horas desde la realización del muestreo. Luego las muestras fueron filtradas (filtro *Sartorius* de nitrato celulosa con un diámetro de 47 mm y un tamaño de poro de 0.45 µm). Los filtros fueron guardados a -80°C hasta su posterior análisis. Los puntos fueron seleccionados por su importancia en el tratamiento del agua. El primer punto de muestreo es el afluente que representa el agua cruda que entra a la planta y en ella tenemos la comunidad microbiana de la población conectada al saneamiento. El reactor es la unidad central del tratamiento donde se dan los procesos de biodegradación de la materia orgánica, es la etapa de mayor interés biotecnológico. El efluente previo al UV representa el agua clarificada que sale del sedimentador antes de la desinfección. El efluente después de UV representa el agua tratada y desinfectada. El cauce receptor es el cuerpo de agua donde se descarga el efluente de la planta. En este, tenemos dos puntos de muestreo, aguas arriba, este es un punto no impactado por el efluente, cien metros aguas arriba de la descarga. Aguas abajo sería el punto impactado por el efluente cien metros aguas abajo de la descarga. La única diferencia entre las plantas que se tomó en consideración para el muestreo es la utilización de dos reactores en la planta de Minas. Para esta planta se tomaron muestras de ambas salidas de los reactores.

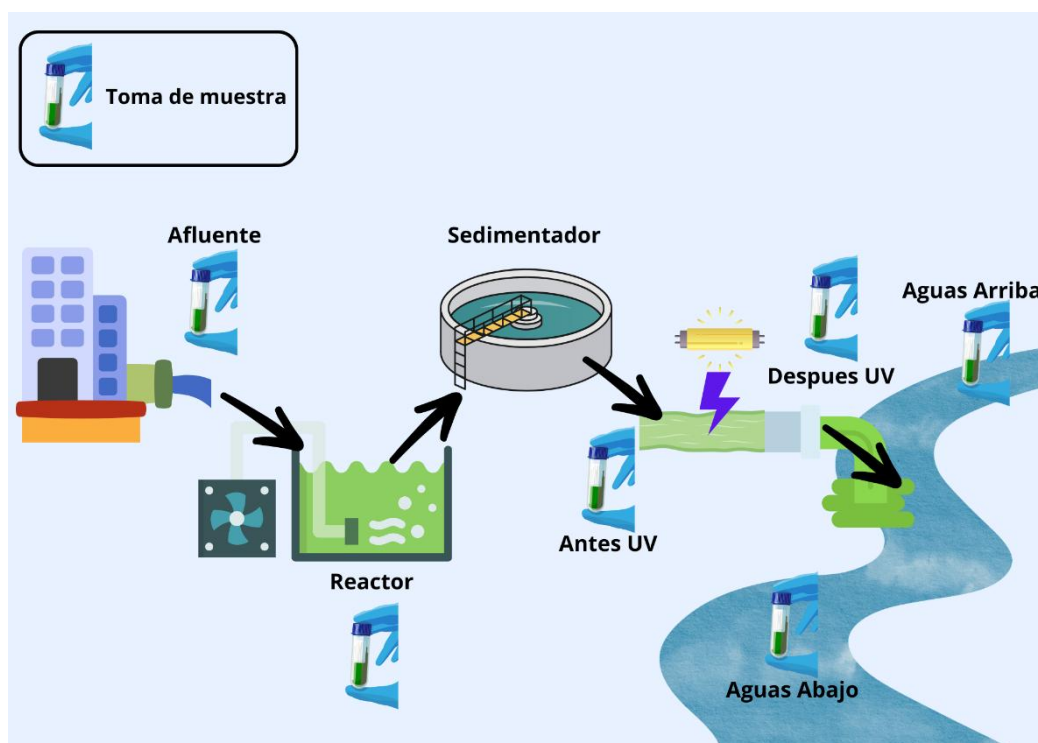


Figura 6: Esquema de los puntos de muestreo de las plantas y los cauces receptores.

4.3 Análisis fisicoquímicos y bacteriológicos

La DBO₅ se realizó según SMEWW ed. 22 5210B, La DQO según SMEWW ed. 22 5220D, el Nitrógeno Kjeldahl según SMEWW ed. 22 4500 Norg. D, el Fósforo total (PT) SMEWW ed. 22 4500 PT, el Amonio SMEWW ed. 22 4500 NH₃ D, el Nitrato SMEWW ed. 22 4500 NO₃ D. Para los análisis bacteriológicos, *Escherichia coli* se realizó por NMP según SMEWW ed. 21 9223B. Los análisis se realizaron en el laboratorio regional sureste o en el laboratorio central de OSE, Uruguay. Para esta tesis resultados de los análisis con una disminución del parámetro de 90% se considera una alta remoción y valores menores al 70% una baja remoción.

4.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de Biología Molecular (CURE Maldonado), con un kit *Powersoil* de *MOBIO* con modificaciones. Este kit fue seleccionado debido a su robustez y calidad de ADN producido en muestras complejas como lo son las muestras de materia fecal debido a la presencia de inhibidores. Los filtros fueron cortados con bisturí estéril en pequeños trozos y fueron colocados en tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL con microesferas de vidrio y buffer de lisis provistos en el kit. Para la lisis celular se utilizó vortex con un adaptador donde se colocaron los tubos horizontalmente y se agitó por 20 minutos a la máxima velocidad. Luego se continuó con los pasos según lo indicado en el protocolo del kit *Powersoil*.

Para los análisis de Ampliseq se realizó una nueva extracción de ADN ya que la extracción con el kit *Powersoil* no dio resultados. La extracción se realizó de acuerdo con el método descrito por Deus et al. (2020) donde la extracción de ADN se basó en la ruptura física de las células y la purificación de los ácidos nucleicos. Los filtros se cortaron asépticamente en pequeños trozos y se colocaron en tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL que contenían 10 mg de microesferas cerámicas (diámetro = 1.4 mm, Quackenbush Co. Inc) y buffer de lisis. La lisis celular se logró mediante un tratamiento con *FastPrep* (MP Biomedicals) (homogeneizador de banco de alta velocidad) a 6 ms⁻¹ durante 40 s. Luego, los lisados celulares se centrifugaron para sedimentar los residuos y el sobrenadante se sometió a 3 extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El ADN fue precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 1h. Las extracciones fueron purificadas empleando *PurePrep 32* (*Molgen*). La cuantificación de la concentración del ADN se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm con *NanoDrop* y la fluorescencia con *Qubit*. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C.

Otra de las medidas de calidad que tomamos fueron las relaciones de absorbancia. La relación A₂₆₀/A₂₈₀ la cual mide la pureza del ADN indicando la proporción entre la absorción de luz a 260 nm (asociada con el ADN) y la absorción a 280 nm (asociada con las proteínas). Una relación A₂₆₀/A₂₈₀ de alrededor de 1.8 a 2.0 se considera óptima. La otra relación utilizada para medir la calidad de las extracciones fue la de absorbancia

A260/A230, esta es una relación que evalúa la presencia de contaminantes químicos y se usa para medir la eficacia de la eliminación de compuestos orgánicos y sales. Una relación A260/A230 de alrededor de 2.0 a 2.2 es deseable.

4.5 PCR

Las reacciones de PCR para la secuenciación del gen ARNr 16S se realizaron en Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, en campana de flujo laminar. La enzima utilizada fue una taq HiFi Q5 de *New England biolabs* (NEB), con su respectiva máster mix. Para la primera reacción, la mix que se preparó fue 12,5 µL de master mix, y 0,2 µM de primer reverse, luego en cada tubo se agregó 0,2 µM de primer forward, 20 ng de ADN y agua ultrapura para completar los 25 µL del tubo de PCR. Las condiciones del ciclado fueron 98° C por 1 minuto, luego 35 ciclos de 98° C por 15 segundos, 55°C 30 seg. y 65°C 45 seg. Luego de los 35 ciclos se realizó un paso de 65°C por 5 minutos.

Los cebadores utilizados fueron extraídos de la literatura (Claesson, 2010), diseñados para amplificar la región V4 del gen 16S. El tamaño esperado del amplicón es de 325 bp. Cada *primer forward* contenía un *barcode* que permite diferenciar las muestras en pasos posteriores.

Tabla 4: Primers utilizados para la amplificación del gen ARNr 16S

520f - AYTGGG YDTAAAGNG
802r - TACNVGGGTATCTAATCC

Para visualizar las reacciones de PCR se realizaron geles de agarosa al 1x en buffer TBE y para observar las bandas en el transiluminador se utilizó *GelRed* (Biotium). Este es un tinte fluorescente para ácidos nucleicos sensible, diseñado para reemplazar al bromuro de etidio para la tinción de dsDNA, ssDNA o RNA en geles de agarosa. Se agregó 1 µL de *GelRed* por cada 100 mL de gel. Los geles se corrieron a 100 voltios durante 45 minutos. Las muestras se corrieron junto a un marcador de peso molecular de 1 kb. Las bandas de interés fueron recortadas y purificadas con un kit de *Ampure* según las instrucciones del fabricante antes de mandar a secuenciar.

Para visualizar las muestras de PCR multiplex del panel de Ampliseq se utilizó un *Bioanalyzer*, este equipo utiliza una técnica conocida como electroforesis capilar en microchips para separar y analizar muestras. La muestra preparada se carga en un microchip que contiene una red de canales y electrodos que permiten la separación y análisis. Para las muestras de este trabajo se utilizó un microchip DNA 1000, este chip está diseñado para analizar fragmentos de ADN en el rango de tamaño de 25 a 1000 pares de bases (pb), este es el rango de los amplicones esperados. Además, tiene un poder de resolución y precisión que permite diferenciar secuencias por unas pocas bases, perfecto para visualizar los productos de reacción de una PCR multiplex.

4.6 Secuenciación gen ARNr 16S

La secuenciación del gen de ARNr 16S se realizó en la plataforma de secuenciación masiva del IIBCE y se llevó a cabo utilizando la tecnología Ion Torrent basada en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN. El proceso de preparación del molde y carga del chip se automatizó utilizando un Ion Chef. La corrida de secuenciación fue compartida entre varios usuarios del Instituto y se utilizó 1 chip 530 con capacidad para aproximadamente 15 millones de lecturas. El mismo se corrió en un Ion GeneStudio S5 System utilizando el siguiente kit: Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit – Chef (1 sequencing run per initialization). Los *primers* fusión utilizados están compuestos por dos partes principales, una región de unión al adaptador y una secuencia específica de la muestra que se va a secuenciar. La región de unión al adaptador es común a todos los *primers* de fusión y es necesaria para que los *primers* se unan a los adaptadores presentes en las esferas de amplificación (beads) utilizadas en el sistema de Ion Torrent. La región de unión al adaptador se corresponde con la secuencia de los adaptadores utilizados en el flujo de trabajo de Ion Torrent. La secuencia específica de la muestra es la parte del primer está diseñada para ser específica de la región de interés en el ADN de la muestra que se desea secuenciar. La secuencia específica se diseña de manera que se hibride correctamente con la región objetivo del ADN y permita la amplificación selectiva de esa región durante la PCR. Además de estas dos regiones existe una región código de barra o *barcode*, también conocida como secuencia de etiqueta o identificador único, se utiliza en los *primers* para introducir una secuencia distintiva en cada muestra durante la preparación de la biblioteca de secuenciación. Estas secuencias *barcode* permiten la identificación y el etiquetado individual de cada muestra en una mezcla multiplexada, lo que facilita la posterior asignación de las secuencias generadas a sus respectivas muestras durante el análisis de datos.

4.7 Secuenciado masivo dirigido (target sequencing) a múltiples dianas

En base a los genomas de un catálogo de agentes patógenos previamente seleccionados, se diseñó en los Departamentos de Genómica y Microbiología del IIBCE un conjunto de cebadores que amplifican regiones específicas de cada patógeno (Tabla 1). Se preparó una biblioteca de amplicones a partir de PCRs multiplex con la metodología Ion Ampliseq DNA Custom panel (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA*), usando *barcodes* para combinar muestras en una misma corrida de secuenciador. La concentración de ADN previamente extraído se midió con *Qubit* en el laboratorio de Genómica (IIBCE). La amplificación se realizó también en el laboratorio de Genómica (IIBCE). En principio para las PCRs se utilizó Ion Ampliseq HiFi Master Mix y los Ampliseq Custom primer pools, se amplificaron por 2 min a 99°C, seguido de 15 ciclos de 99°C de 15 segundos y 60°C por 4 min, terminando con un período de 10°C en un termociclador. Estas temperaturas y ciclados son lo recomendado por el fabricante, en este trabajo también se hicieron reacciones con 20, 25 y 35 ciclos. El límite de cuantificación se evaluó en González 2020 y se comprobó que con un aumento a 23

ciclos de PCR se podían cuantificar los genes a una concentración mínima de 30 genomas/ μ L.

4.8 Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas con los adaptadores previamente removidos fueron analizadas con FastQC para observar la calidad de las secuencias (distribución de tamaños, contenido de GC, *quality scores*, contenido de N por base, niveles de duplicación y secuencias sobrerrepresentadas) (Andrews, 2010). Con estos datos se cortaron las secuencias con Trimmomatic a través de la plataforma de usegalaxy.org de acuerdo con los criterios establecidos en la página de calidad (Q20), tamaño y ambigüedad de bases. Una vez filtradas, las secuencias se analizaron con Rstudio con el paquete Dada2, según el pipeline 1.16 con algunos cambios para secuencias de ion Torrent. Una vez obtenida la tabla de ASVs se mapeó contra archivos de referencia de MIDAS 4.8.1. MIDAS es un base de datos para obtener información sobre los microorganismos en los ecosistemas de lodos activados, digestores anaeróbicos y sistemas de tratamiento de aguas residuales relacionados, como *biofilms*, gránulos y biorreactores de membrana (Dueholm, 2022). La tabla de ASVs fue filtrada, los valores con menos de 50 reads fueron removidos para eliminar el ruido que puede haber sido generado por errores de amplificación o de secuenciación.

4.9 Análisis de los datos

Los distintos puntos de muestreo de cada planta (3 afluentes, 4 reactores, 3 efluentes, 3 cauces aguas arriba y 3 aguas abajo) fueron utilizados para los análisis. Cada punto de las PTAR fue considerado como una réplica independiente de una misma condición. Los análisis de rarefacción y los índices de diversidad Alfa fueron realizados con el software Past 4.10 (Hammer, 2001), se calcularon los índices de diversidad Shannon y Simpson, la riqueza de especies y la equitatividad de Pielou. Para probar la normalidad de los datos de los índices se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. A los datos con una distribución normal se le realizó un ANOVA y post hoc un análisis de Tukey. Los índices que no tuvieron una distribución normal se les realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis y en el caso de existir diferencias significativas se siguió con una comparación de Dunn con el método de Bonferroni. Los índices de la diversidad alfa fueron graficados en el programa Rstudio como boxplots. Para la evaluación de las comunidades dentro de las plantas se utilizó el porcentaje promedio de la abundancia relativa (*Mean Real Abundance %*) para graficar los filos más representativos. Todos los filos cuya abundancia relativa era menor a 5% en los diferentes puntos de muestreo no se consideraron predominantes y se agruparon como “otros”. Al analizar a los géneros más abundantes de las diferentes etapas de muestreo se realizó un corte de la abundancia relativa en 3%, considerándose dominantes en las comunidades cuando alcanzaban al menos dicho valor. El resto de los géneros cuya abundancia relativa fue

menor a 3%, quedaron representados en otros. Para evaluar si existían diferencias significativas entre las comunidades de los puntos muestreados se realizó un análisis de One Way ANOSIM en el software Past 4.10 con 9999 permutaciones utilizando la distancia de Bray Curtis. El One Way ANOSIM es una prueba no paramétrica, que permite evaluar si existen diferencias significativas entre las comunidades de los puntos de muestreos. El valor de coeficiente R del ANOSIM puede dar valores entre 1 y -1, los valores más cercanos a 1 muestra una mayor disimilitud y cuanto más cerca de 0 muestra una mayor similitud entre comunidades. Para visualizar cómo se agrupan las comunidades de los puntos de muestreo se utilizó un análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) para los diferentes grupos con el mismo software, utilizando la distancia de Bray Curtis, en dos dimensiones y sin variantes ambientales. Por último, se realizó un análisis de SIMPER con la distancia de Bray Curtis para evaluar cuales son los ASVs, que más peso tuvieron en la diferenciación entre los grupos significativamente diferentes encontrados con el análisis de ANOSIM. Los gráficos se realizaron en Rstudio con el paquete ggplot, en Past4 o en Excel

5 Resultados

5.1 Datos fisicoquímicos y bacteriológicos de rutina

En las plantas de tratamiento estudiadas se evaluaron los datos fisicoquímicos obtenidos por los monitoreos de rutina de la OSE. En la tabla se puede observar los datos fisicoquímicos que se realizan en los afluentes y los efluentes de las tres plantas de tratamiento. Se observan altos porcentajes de remoción para DQO, Nitrógeno Kjeldahl (NK) y Amonio en la mayoría de los casos. Para los datos de Fósforo total (PT) se observa una alta remoción en la planta de Treinta y Tres, una baja remoción en Minas y un aumento de la concentración de PT en José Pedro Varela. Para los datos de nitrato vemos que en todos los casos pasamos de valores por debajo del límite de cuantificación a valores superiores, siendo la planta de José Pedro Varela la de mayor producción de nitrato. En las tablas S2, S3 y S4 del anexo podemos ver datos fisicoquímicos y bacteriológicos de los cauces.

Tabla 5: Datos fisicoquímicos de los afluentes y de los efluentes de las plantas de tratamiento. Las fechas mostradas son los días que se realizó el muestreo para el análisis genómico. Se puede observar las eficiencias de remoción de contaminantes de cada planta.

			DBO5 mg/L	remoción% DBO5	DQO mg/L	remoción% DQO	NK mg/l	remoción% NK	Amonio mg/L-N	remoción% Amonio	Nitrato mg/L-N	PT mg/L	remoción% PT
Minas	27/11/2019	Afluente	392	94	434	92	45,9	95	34	97	<1,0	4,48	37
		Efluente	25		34		2,4		1		17	2,82	
Treinta y Tres	26/12/2019	Afluente	275	85	434	91	65	75	44	68	<1,0	5,59	96
		Efluente	41		38		16,5		14		12	0,21	
José Pedro Varela	07/11/2019	Afluente	87	86	145	90	25	91	21	95	<1,0	2,79	-19
		Efluente	12		15		2,21		<1,0		30	3,32	

En relación con los datos bacteriológicos monitoreados, en la Figura 8A se presentan los datos cuantitativos de *E. coli* de los muestreos de OSE para los efluentes antes y después de UV en la planta de José Pedro Varela. La mayoría de los datos del efluente después UV cumplen con la normativa, solo en tres ocasiones podemos ver en la gráfica el efluente después UV excede del valor máximo permitido de 5000 NMP/100ml. En esta gráfica también está el porcentaje de transmitancia del efluente. La transmitancia se mide para evaluar la turbidez del agua tratada a la longitud de onda utilizada para la

desinfección UV, esta es información importante para la operativa de la planta. Los datos son de los años 2019 y 2020. La gráfica muestra valores de *E. coli* superiores para los efluentes AUV que para los efluentes DUV. Existen momentos puntuales en la planta donde se observa aumentos en los conteos de *E. coli* tanto para los efluentes antes y después de UV con bajadas marcadas en el porcentaje de transmitancia. La transmitancia en esta planta es la menor de las tres, con un promedio de 51 % y el promedio de *E. coli* en el efluente antes de UV es de 45000 NMP/ 100 ml.

En el gráfico se diferenció el día del muestreo para los análisis moleculares, en ese día la gráfica muestra el valor cuantificado. El muestreo de ese día para José Pedro Varela muestra un descenso de *E.coli* de un orden.

En la Figura 8B vemos los datos de *E. coli* para los efluentes antes y después de UV de los años 2019 y 2020 pero para la planta de Treinta y Tres. En este caso se tienen más puntos debido a que el monitoreo de esta planta tiene una mayor frecuencia que la anterior. Todos los datos bacteriológicos del efluente después de UV cumplen con la normativa. Los datos muestran en la mayoría de los casos un descenso en la cantidad de *E. coli* luego del tratamiento con UV, en el día de muestreo para los análisis moleculares se observa un descenso de tres órdenes. El promedio de la transmitancia en esta planta es del 60 % y el promedio de *E. coli* en el efluente antes de UV es cercano a 91000 NMP/100 ml. Este número es mayor que el de las otras dos plantas.

En la Figura 8C se muestran los datos de *E. coli* de los efluentes para la planta de Minas del 2019 y 2020. Esta planta tiene una frecuencia de monitoreo similar a la planta de Treinta y Tres. Todos los datos bacteriológicos del efluente después de UV cumplen con la normativa vigente. Se observa, como en la planta anterior, un descenso de *E. coli* en los efluentes después del tratamiento UV. El promedio de *E. coli* antes de UV es de 38000 NMP/ 100 ml y de la transmitancia es de 60 %

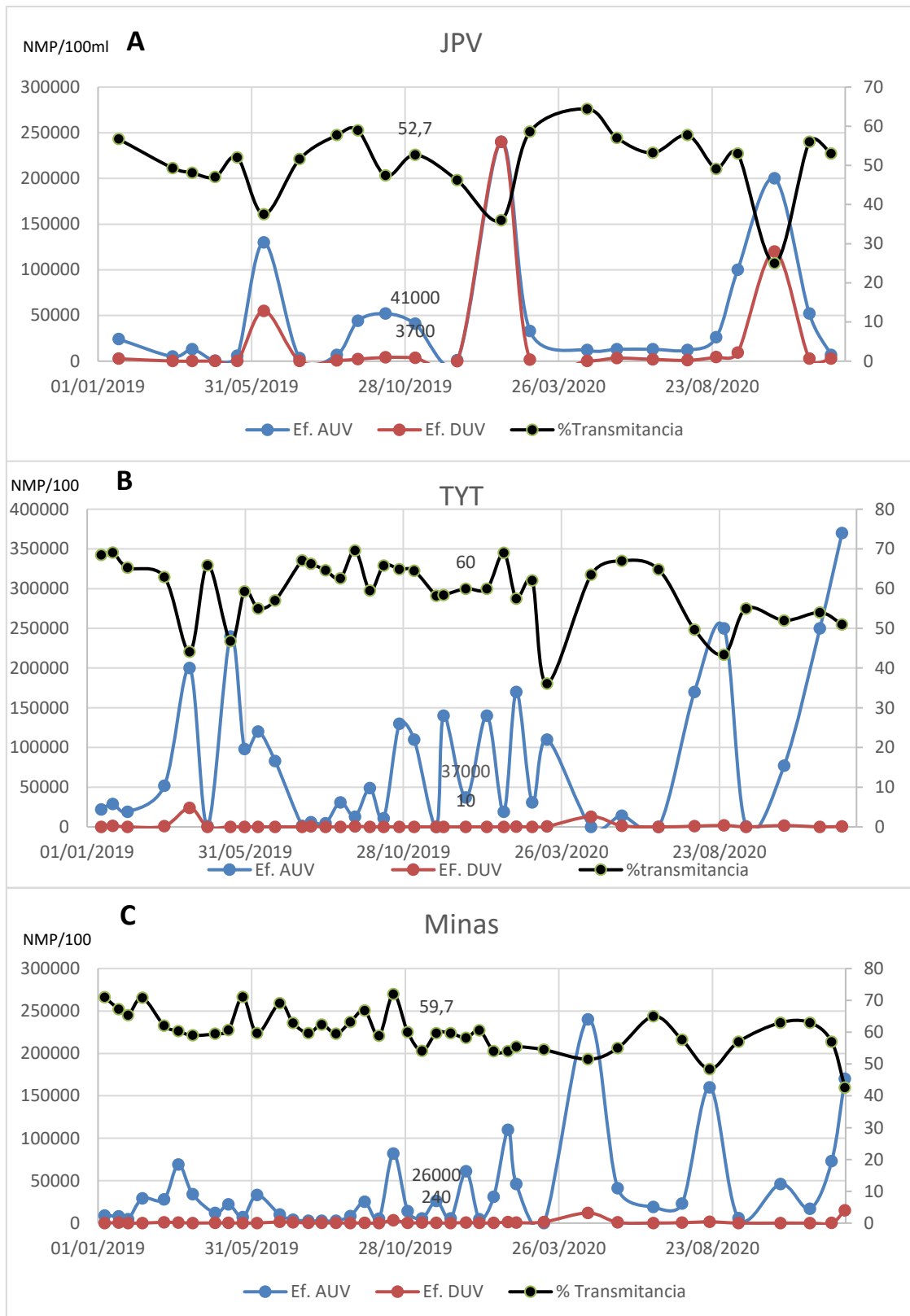


Figura 7: Datos del monitoreo de OSE del 2019 y 2020 de Escherichia Coli en los efluentes antes y después del UV, más el porcentaje de transmitancia de los efluentes para las plantas de A: José Pedro Varela, B: Treinta y Tres y C: Minas

5.2. Cantidad y calidad del ADN extraído

La extracción de ADN de las muestras para el análisis del gen ARNr 16S se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del CURE con el kit POWER SOIL utilizando un vortex como medio físico para romper las células. Luego de la extracción se midieron las concentraciones por *Nanodrop* y *Qubit* obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 6. Los datos de concentración medidos con *Nanodrop* dan valores mayores que los valores medidos con *Qubit*, pero siguen la misma tendencia en cuanto a concentraciones, donde los valores con menos ADN son los cauces receptores. La extracción de ADN para el Ampliseq se realizó utilizando el servicio de extracción de ADN del Clemente Estable según Deus et. al. (2020), este método semiautomatizado obtuvo valores mayores de ADN para las muestras de los efluentes de las tres plantas (tabla 6). La calidad de las extracciones se midió con las relaciones de absorbancia. La relación de absorbancia de 260/280 muestra en la mayoría de los puntos valores de 1.8 o superiores. Lo que da cuenta de una buena extracción. Para la relación de absorbancia de 260/230, vemos que para la primera extracción se obtienen valores bajos, lo ideal son valores mayores a 1.8, en cambio para la extracción que se realizó en el Clemente Estable vemos una mejor relación, lo que indica, además de una mayor concentración, una mejor calidad de la extracción.

Tabla 6: Extracciones de ADN para el análisis del gen 16s y del secuenciado masivo dirigido a múltiples dianas. En la tabla se observa la calidad y cantidad de la extracción de ADN en cada punto con los dos métodos de extracción. La concentración de ADN fue medida por dos métodos diferentes, Nanodrop y Qubit.

ADN para gen ARNr 16S (Powersoil MOBIO)						ADN para Ampliseq			
Localidad	Muestra	Concentración de ADN-Nanodrop (ng/μL)	260/280	260/230	Concentración de ADN-Qubit (ng/μL)	Abs (260)	Nanodrop(ng/uL)	260/280	260/230
Minas	Afluente instantáneo	13,7	2	0,7	9,12				
Minas	Reactor aerobio 1	14,6	2	0,6	8,2				
Minas	Reactor aerobio 2	15,9	2	0,3	7,82				
Minas	Efluente antes de UV	5,8	3,2	0,4	2,02	1,6	78,2	2	1,9
Minas	Efluente después de UV	7	2,1	0,4	2,04	0,7	36,9	2	1,6
Minas	Aguas Arriba	4	2,9	0,2	0,32				
Minas	Aguas Abajo	4,8	2,6	0,2	0,61				
José Pedro Varela	Afluente instantáneo	11	2,1	0,6	4,14				
José Pedro Varela	Reactor aerobio (zanja)	18,2	1,8	0,9	10,1				
José Pedro Varela	Efluente antes de UV	11,1	2,1	0,6	7,22	1,7	82,9	2	1,7
José Pedro Varela	Efluente después de UV	11,7	1,9	0,8	5,04	1,2	58,7	2	1,6
José Pedro Varela	Aguas Arriba	7,4	1,4	0,5	1,46				

José Pedro Varela	Aguas Abajo	6,6	2,7	0,4	1,82				
Treinta y Tres	Afluente instantáneo	15,3	1,8	0,9	8,26				
Treinta y Tres	Reactor aerobio 3	14,5	1,9	0,8	6,64				
Treinta y Tres	Efluente AUV	13,2	2,1	0,8	7,42	1,4	60	2	2,2
Treinta y Tres	Efluente DUV	11,1	1,8	0,6	6,2	1,4	72,5	2,2	2,3
Treinta y Tres	Aguas Arriba	6,9	1,8	0,5	0,85				
Treinta y Tres	Aguas Abajo	5,9	1,5	0,4	0,43				

5.3 Amplificación del gen ARNr 16S por PCR

Para la secuenciación del gen del gen ARNr 16S se realizaron PCR con cebadores específicos (tabla 4) con todas las muestras extraídas. Parte de los resultados se muestran en la figura 9 en donde se observa en la corrida del bionalyzer productos de PCR con una cantidad de bases cercanas a 300 bp, este es el tamaño esperado del amplicón para los cebadores utilizados. Para las muestras del afluente y los efluentes antes y después de UV de José Pedro Varela podemos ver algunas bandas de amplificación inespecífica de mayor bp. Existen también algunas bandas de alrededor de 100 bp en muestras de algunos reactores, de los cauces de Minas y de los efluentes de José Pedro Varela. Algunas de estas muestras dieron bajos niveles de eficiencia en la extracción de ADN posiblemente debido a la presencia de inhibidores. Estas bandas menor intensidad pueden corresponder a dímeros de los cebadores.

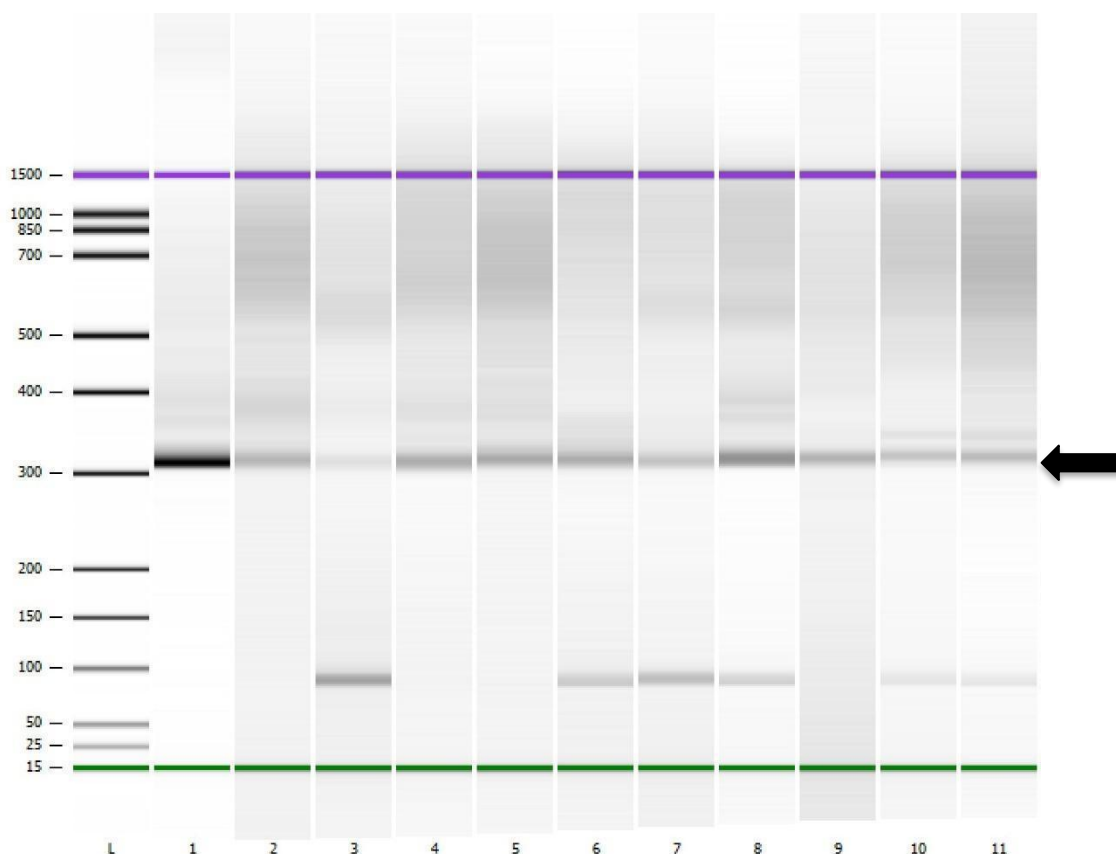


Figura 8: Corrida de Bioanalyzer para los resultados de la PCR del gen de ARNr 16S de las primeras 10 muestras. En la flecha se muestra el producto de PCR buscado. Carril 0: marcador de peso molecular, Carril 1: Afluente Minas, Carril 2: Reactor 1 Minas, Carril 3: reactor 2 Minas, Carril 4: Efluente AUV Minas, Carril 5: Efluente DUV Minas, Carril 6: Aguas arriba Minas, Carril 7: Aguas Abajo Minas, Carril 8: Afluente JPV, Carril 9: Reactor JPV, Carril 10: Efluente AUV JPV, Carril 11 Efluente DUV JPV.

5.4 Curvas de rarefacción

Para evaluar si se logró capturar toda la riqueza de las muestras con la profundidad de secuenciado realizado se crearon curvas de rarefacción para las plantas. En la figura 9 se observa como todas las curvas alcanzan una meseta, esto indica que se ha alcanzado la riqueza máxima de las muestras. Esto demuestra también que la

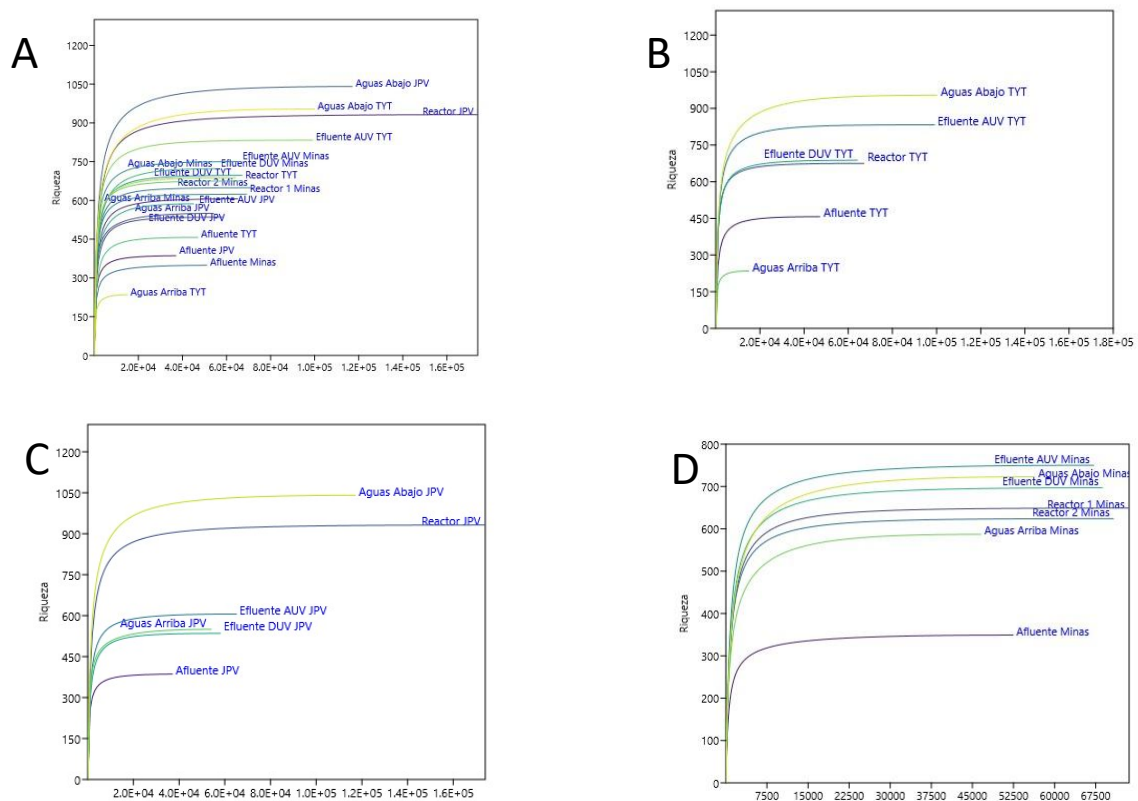


Figura 9: Curvas de rarefacción de la secuenciación del gen 16s para todas las muestras analizadas. A: Curva conjunta con todos los puntos de las tres plantas, en el eje Y se muestra la riqueza y en el eje X la profundidad del secuenciado. B: Curva de rarefacción para la planta de Treinta y Tres. C: Curva de rarefacción para la planta de José Pedro Varela, D: Curva de rarefacción de la planta de Minas

secuenciación fue suficiente para obtener todos los datos riqueza en las muestras. En la figura 9 A tenemos las curvas de todos los puntos de las tres plantas juntos. En la figura 9 B, 9 C y 9 D se muestran las curvas para los puntos de muestreo de cada planta. En esta imagen podemos ver que tanto Treinta y Tres y José Pedro Varela llegan a tener una riqueza cercana a 1000 ASVs, pero para Minas vemos una diferencia en donde el punto de muestreo con mayor riqueza de esta planta alcanza aproximadamente 800 ASVs. Vale la pena destacar en estas imágenes como las muestras con mayor cantidad de ASVs en dos de las tres plantas son los puntos de aguas abajo y en todos los casos se ve un aumento de ASVs entre aguas arriba y aguas abajo. Otro punto que observar es

como en todas las plantas el efluente AUV tiene mayor cantidad de ASVs que el efluente DUV. Por último, vemos como los puntos de menor riqueza en dos de las tres plantas, con la tercera teniéndolo en el segundo lugar, son los afluentes.

5.5 Diversidad alfa

A través de los datos adquiridos de la secuenciación del gen ARNr 16S se realizaron representaciones gráficas de la riqueza y diversidad de especies en los diferentes puntos de muestreo. En la figura 10 se observa cómo evoluciona la riqueza dentro de las plantas. Los puntos de menor riqueza son los afluentes y aguas arriba de las plantas, y los de mayor riqueza los cauces aguas abajo. Existe diferencias significativas ($p < 0,05$) para la riqueza entre los afluentes y el reactor y el cauce aguas abajo, también existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aguas arriba con aguas abajo y también vemos diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el reactor con aguas arriba. Los efluentes antes y después de UV se ven bastante similares con una leve baja de riqueza en los efluentes después de UV. Los índices Shannon y Simpson se observan en las figuras 11 y 12. Para estos índices no hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) pero aun así podemos ver en las imágenes como la diversidad de los puntos de los afluentes, y aguas arriba fue la menor según el índice de Shannon y el punto aguas abajo es el de mayor diversidad. En el caso del índice de Simpson, la diferencia entre los afluentes y los demás puntos es clara, lo que evidencia una mayor dominancia de algunas especies en estos puntos. El resto de los puntos muestran una dominancia menor, con todos los puntos en valores similares.

En la figura 13 se muestra un gráfico de equitatividad, este índice tampoco tuvo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos de muestreo. De todas maneras, podemos ver en este gráfico como los puntos de los afluentes son los menos uniformes.

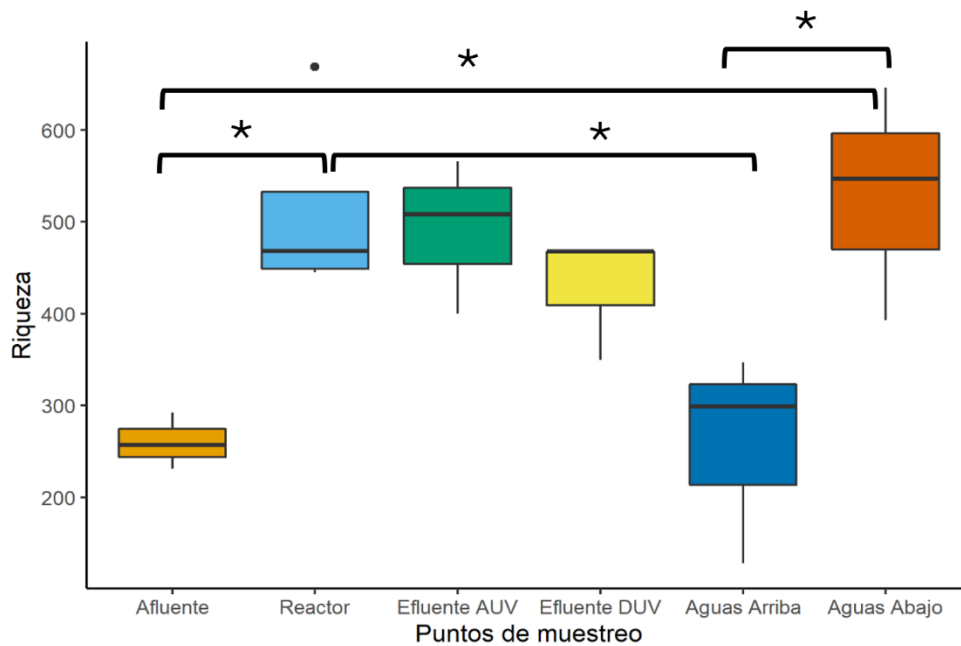


Figura 10: Riqueza de especies bacterianas en los diferentes puntos de las plantas. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente). * diferencia significativa $p=0,05$

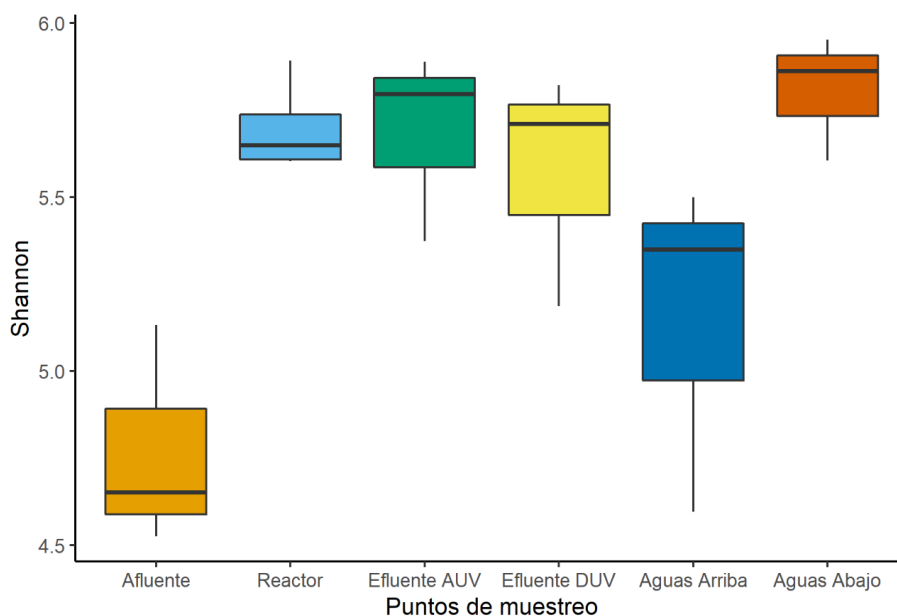


Figura 11: diversidad alfa, índice de Shannon de los diferentes puntos de muestreo de las tres plantas de tratamiento. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente).

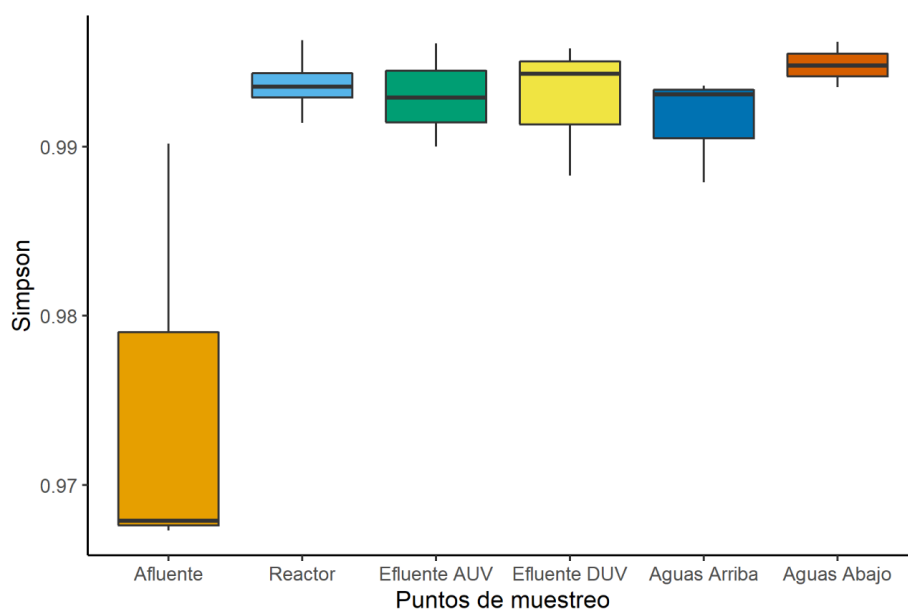


Figura 12: Diversidad alfa. Índice de Simpson de los diferentes puntos de muestreo. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente).

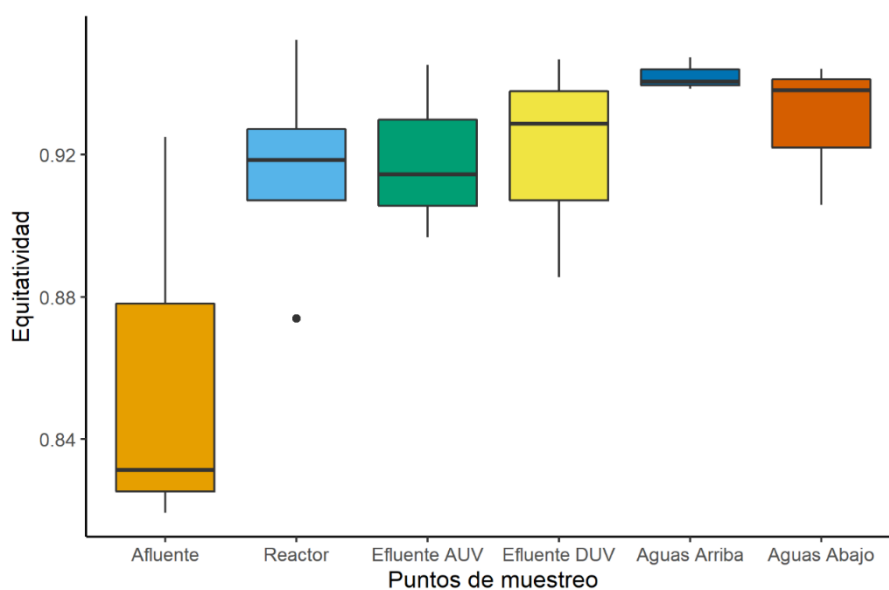


Figura 13: Equitatividad de Pielou de los diferentes puntos de muestreo. Afluente, reactor, efluente antes del tratamiento con UV, efluente después del UV, Aguas Arriba (curso de agua receptor, a 100 metros aguas arriba de la salida del efluente), Aguas Abajo (curso de agua receptor, 100 metros aguas abajo de la salida del efluente).

5.6 Diversidad Beta

Para determinar si existen cambios en la estructura comunitaria bacteriana a lo largo del proceso de tratamiento, desde los afluentes a los cauces receptores, se aplicaron distintos análisis. Con el *One Way* ANOSIM se observó que las comunidades bacterianas de los reactores fueron significativamente diferentes a las comunidades de los afluentes y a la de los cauces receptores (p valor < 0.05 , Tabla 7). El valor de coeficiente R del ANOSIM entre todos los puntos fue de 0,5644, este valor más cercano a 1 muestra la disimilitud de las comunidades. Para observar las diferencias se realizó un escalamiento no métrico multidimensional (NMDS) (Figura 14). El NMDS representa gráficamente una serie de puntos de muestreo en un sistema de coordenadas bidimensional en función de la similitud o disimilitud de las comunidades. Cuanto más similares sean las comunidades más cercanas aparecen los puntos en el espacio, cuanto más diferentes más alejados.

Tabla 7: Pairwise ANOSIM, en esta tabla se puede observar los valores para las comparaciones de las diferentes comunidades en los puntos de muestreo. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se resaltan en negrita para los reactores con los afluentes y los reactores con los cauces aguas arriba y aguas abajo.

	Afluente	Reactor	Efluente AUV	Efluente DUV	Aguas Arriba	Aguas Abajo
Afluente						
Reactor	0,029					
Efluente AUV	0,099	0,421				
Efluente DUV	0,104	0,321	1			
Aguas Arriba	0,100	0,034	0,102	0,098		
Aguas Abajo	0,101	0,029	0,107	0,099	0,705	

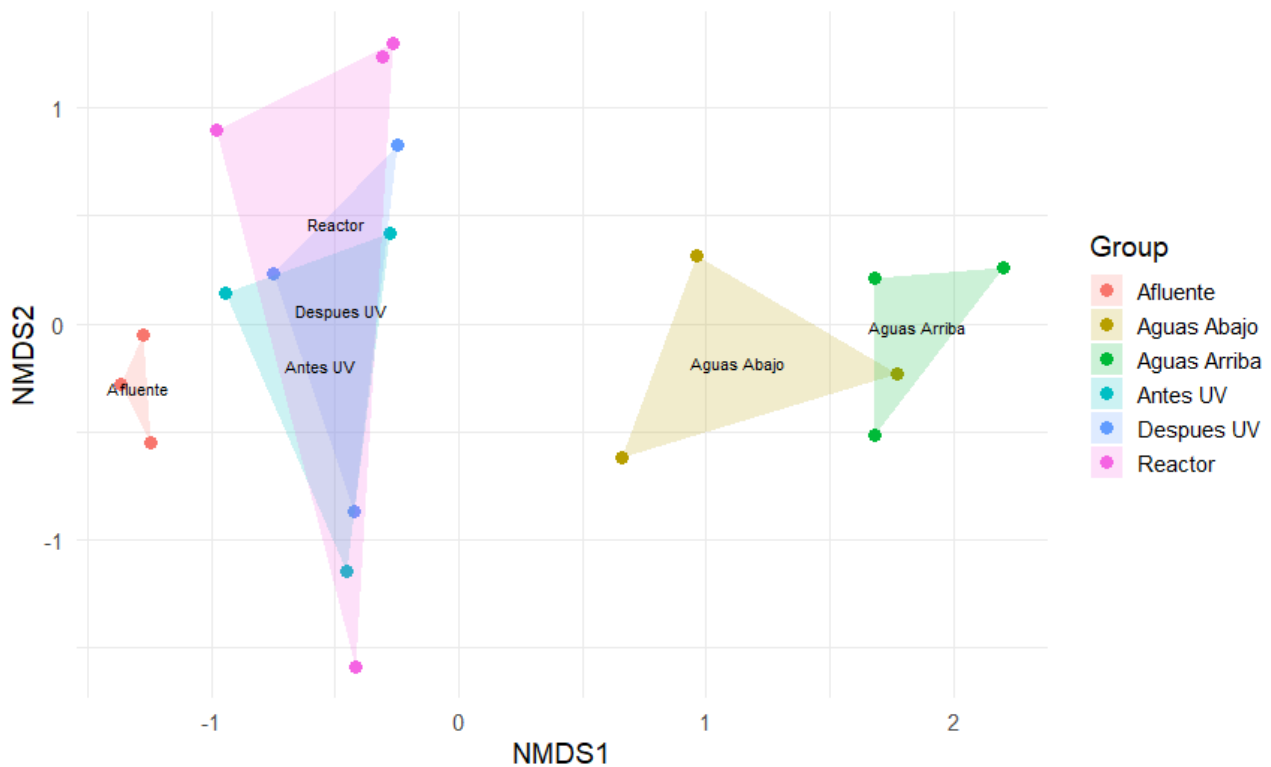


Figura 14: Análisis NMDS con el índice de similitud de Bray Curtis de los diferentes puntos de muestreo. En esta imagen se observa cómo se agrupan las comunidades de los diferentes puntos de muestreo en un sistema bidimensional. Aquí podemos ver la distancia significativa, según el ANOSIM, de los afluentes con los reactores y de los reactores con los cauces.

En la figura 14 se puede observar que las muestras correspondientes a puntos dentro de las plantas de tratamiento se solapan, mientras que el resto se diferencia claramente. Por ej., los afluentes se diferencian de las plantas y de las muestras del arroyo (tanto aguas arriba como abajo). Cabe mencionar que los p valores que dan cuenta de las diferencias entre el afluente y los demás puntos encontrados en el ANOSIM son cercanos a 0.1.

A continuación, se realizó un análisis SIMPER. Este análisis evalúa las contribuciones porcentuales de cada variable individual (ASVs) a la diferencia entre los puntos de muestreo en una matriz de disimilitud de Bray Curtis. El SIMPER se realizó para los puntos de muestreo con diferencias significativas. Estos puntos fueron los reactores y los afluentes, los reactores y los cauces aguas arriba y los reactores con los cauces aguas abajo. En las tablas 8, 9 y 10 se muestran los análisis con los 15 ASV que más contribuyen a las diferencias entre los grupos.

Tabla 8: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 20.5% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y las de los afluentes.

Taxon	Av. dissim	Contrib. %	Cumulative %	Mean Reactor	Mean Afluente
ASV1	5,362	5,706	5,706	0,00285	0,105
ASV2	2,765	2,943	8,648	0,00104	0,0539
ASV5	1,921	2,044	10,69	0,00104	0,0377
ASV8	1,45	1,543	12,23	0,000702	0,0284
ASV17	0,9004	0,9581	13,19	0,00066	0,0179
ASV30	0,7439	0,7916	13,98	0,000368	0,0146
ASV9	0,7422	0,7897	14,77	0,000223	0,0144
ASV12	0,7312	0,7781	15,55	0,0142	0,000266
ASV29	0,7294	0,7761	16,33	3,98E-05	0,014
ASV36	0,7199	0,766	17,09	7,55E-05	0,0138
ASV7	0,7075	0,7529	17,85	0,0135	0
ASV22	0,6714	0,7145	18,56	0,0128	0
ASV4	0,6685	0,7114	19,27	0,0128	0,00018
ASV54	0,5778	0,6148	19,89	0	0,011
ASV56	0,5777	0,6147	20,5	0	0,011

En la tabla 8 se muestran los 15 ASVs con mayor peso contributivo, dan cuenta de un 20,5% de la diferencia entre las comunidades, de los reactores y los afluentes, si observamos la tabla vemos que la mayor parte de los ASVs que más contribuyen a esta diferencia se encuentran en los afluentes y no en los reactores. También podemos ver como los primeros 15 ASVs de los afluentes versus los reactores tienen mayor peso (20,5%) que los primeros 15 ASVs entre los reactores y los cauces (tablas 9 y 10). En estas tablas vemos que el peso de los 15 ASVs que más contribuyen a la diferencia ronda el 10%.

Tabla 9: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 10.3% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y las del cauce aguas arriba.

Taxon	Av. dissim	Contrib. %	Cumulative %	Mean Reactor	Mean Aguas Arriba
ASV11	1,087	1,103	1,103	0	0,0204
ASV13	0,9497	0,9636	2,067	0	0,0178
ASV12	0,733	0,7438	2,811	0,0142	0,000493
ASV7	0,7117	0,7221	3,533	0,0135	0,000436
ASV22	0,6843	0,6943	4,227	0,0128	0,000186
ASV4	0,6764	0,6863	4,913	0,0128	0
ASV43	0,6622	0,6719	5,585	0	0,0123
ASV28	0,6616	0,6713	6,257	0	0,0124
ASV65	0,6285	0,6377	6,894	0	0,0117
ASV39	0,6278	0,6371	7,531	0	0,0119
ASV58	0,5826	0,5912	8,123	0	0,0109
ASV90	0,5453	0,5533	8,676	0	0,0102
ASV77	0,5293	0,5371	9,213	0	0,00991
ASV52	0,5278	0,5356	9,749	0	0,00985
ASV19	0,5033	0,5107	10,26	0,00941	0

Tabla 10: Análisis donde se presentan los 15 ASVs que dan cuenta del 9.2% de las diferencias encontradas entre las comunidades de los reactores y del cauce aguas abajo

Taxon	Av. dissim	Contrib. %	Cumulative %	Mean Reactor	Mean Aguas Abajo
ASV13	0,773	0,8309	0,8309	0	0,0145
ASV12	0,7537	0,8101	1,641	0,0142	0
ASV7	0,7059	0,7587	2,4	0,0135	0,00293
ASV4	0,6943	0,7463	3,146	0,0128	0,00087
ASV11	0,6877	0,7392	3,885	0	0,013
ASV3	0,6789	0,7297	4,615	0,000431	0,0128
ASV22	0,6789	0,7297	5,345	0,0128	0,00166
ASV6	0,5682	0,6107	5,955	0,00037	0,0107
ASV28	0,5034	0,5411	6,496	0	0,00947
ASV19	0,4739	0,5094	7,006	0,00941	0,000622
ASV18	0,4507	0,4845	7,49	0,00924	0,000735
ASV10	0,4343	0,4668	7,957	0,00824	0,000541
ASV43	0,4311	0,4633	8,42	0	0,00814
ASV49	0,3671	0,3946	8,815	0	0,00695
ASV52	0,3663	0,3937	9,209	0	0,00692

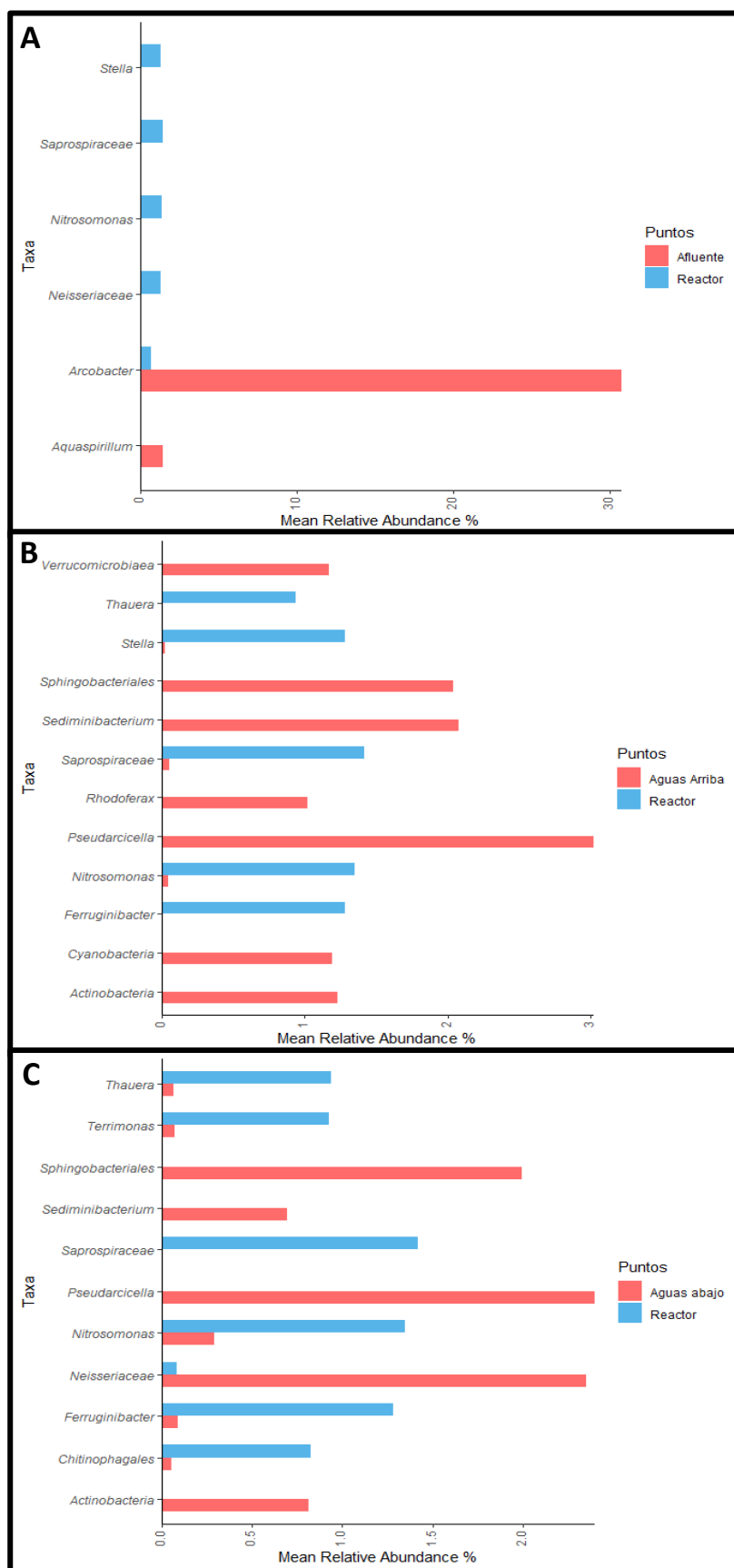


Figura 15. Gráficas que muestran la abundancia relativa de los grupos bacterianos seleccionados que dan cuenta de la diferencia entre las comunidades. **A:** Afluentes vs. Reactores, **B:** Aguas Arriba vs. Reactores, **C:** Aguas Abajo vs. Reactores.

Para visualizar mejor las tablas de los análisis de SIMPER se agrupó a los ASVs de las tablas de acuerdo con los géneros o niveles taxonómicos a los que pertenecían. La figura 15 muestra la abundancia relativa de un género específico en los dos puntos de muestreo para poder visualizar la diferencia de abundancia entre los puntos. En el recuadro A de esta figura podemos observar los géneros de los afluentes en color rosado y los géneros de los reactores en color celeste. En este recuadro vemos que el género *Arcobacter* es el más influyente para la diferenciación de los puntos. Aproximadamente el 30% de los *Arcobacter* secuenciados se encuentran en los afluentes y disminuyen drásticamente en los reactores. En el recuadro B observamos los géneros que muestran diferencias entre los reactores y aguas arriba. *Pseudarcicella* es el género con mayor abundancia relativa en los cauces aguas arriba. En el recuadro C tenemos los géneros que diferencian a los reactores con los cauces aguas abajo, en este caso el género *Pseudarcicella*, la familia *Neisseriaceae* y el orden *Sphingobacteriales* son los que aportan mayores diferencias entre los puntos.

5.7 Composición de la comunidad bacteriana

El estudio de las comunidades a nivel de filos bacterianos para las diferentes etapas del tratamiento en las PTAR se muestra en la figura 16, el análisis indica que en los afluentes los filos más abundantes fueron *Campylobacterota* (39.8%), seguido por *Pseudomonadota* (23.3%), *Bacillota* (antes *Firmicutes*) (14.8%) y *Bacteroidota* (11.6%).

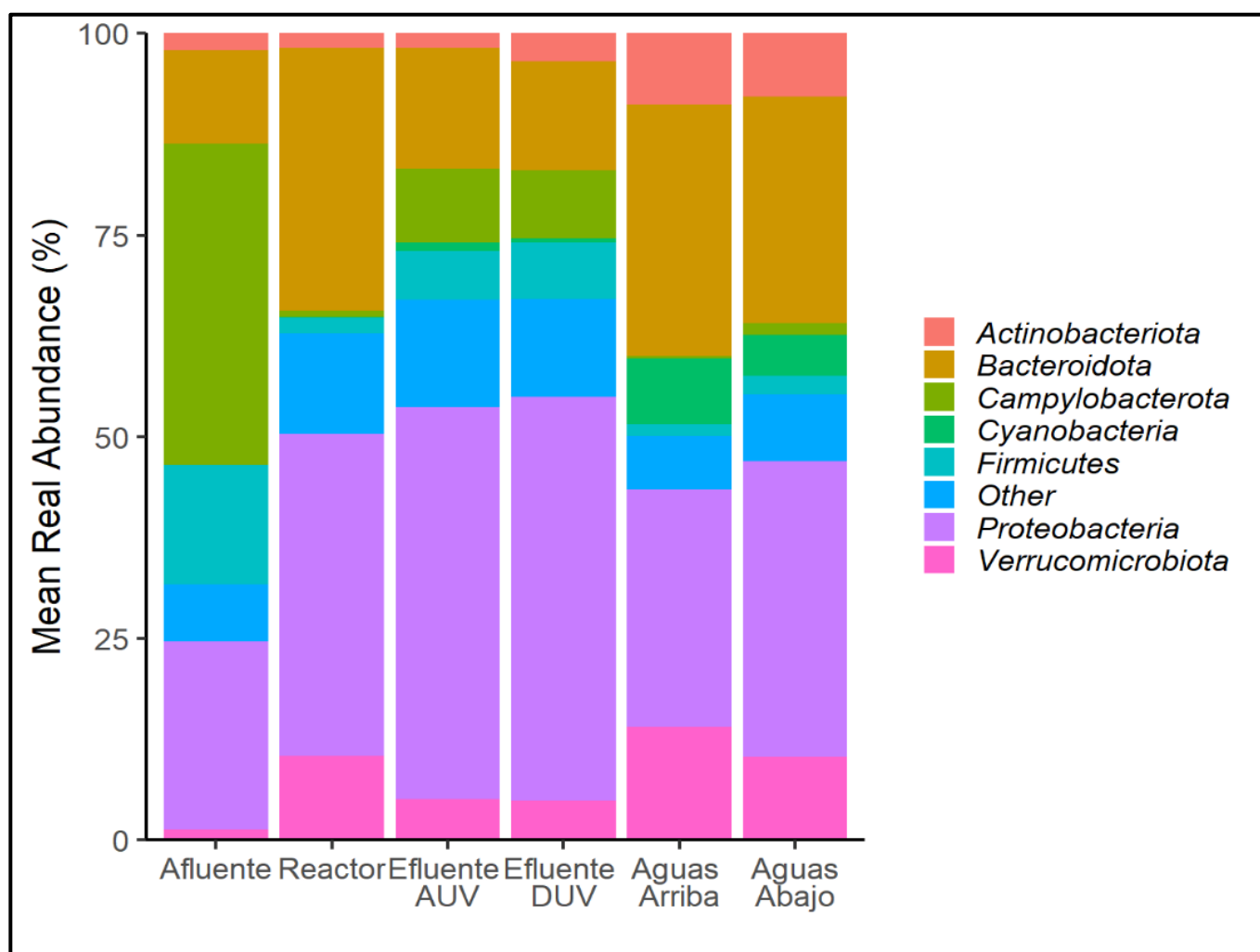


Figura 16. Representación gráfica de los filos predominantes en abundancia relativa de los diferentes puntos de muestreo. Se muestran solo los filos con una abundancia relativa mayor al 5%, el resto de los filos se agrupan en el conjunto "other"

En los reactores los más abundantes fueron los filos *Pseudomonadota* (40.0%), *Bacteroidota* (32.6%), *Verrucomicrobiota* (10.4%), *Bacillota* (2.0%). En los efluentes AUV el filo más abundante fue *Pseudomonadota* (48.6%), seguido por *Bacteroidota* (15.0%), *Campylobacterota* (9.1%), *Bacillota* (6.0%), *Verrucomicrobiota* (5.1%). En los efluentes DUV se mantienen los filos con *Pseudomonadota* (50.1%), *Bacteroidota* (13.6%), *Campylobacterota* (8.4%), *Bacillota* (6.9%) y *Verrucomicrobiota* (4.9%). En los cauces los cuatro filos más abundantes fueron: aguas arriba, *Bacteroidota* (31.1%), *Pseudomonadota* (29.5%), *Verrucomicrobiota* (14.0%), *Actinobacteriota* (8.8%); aguas

abajo *Pseudomonadota* (36.6%), *Bacteroidota* (28.1%), *Verrucomicrobiota* (10.3%), *Actinobacteriota* (7.8%).

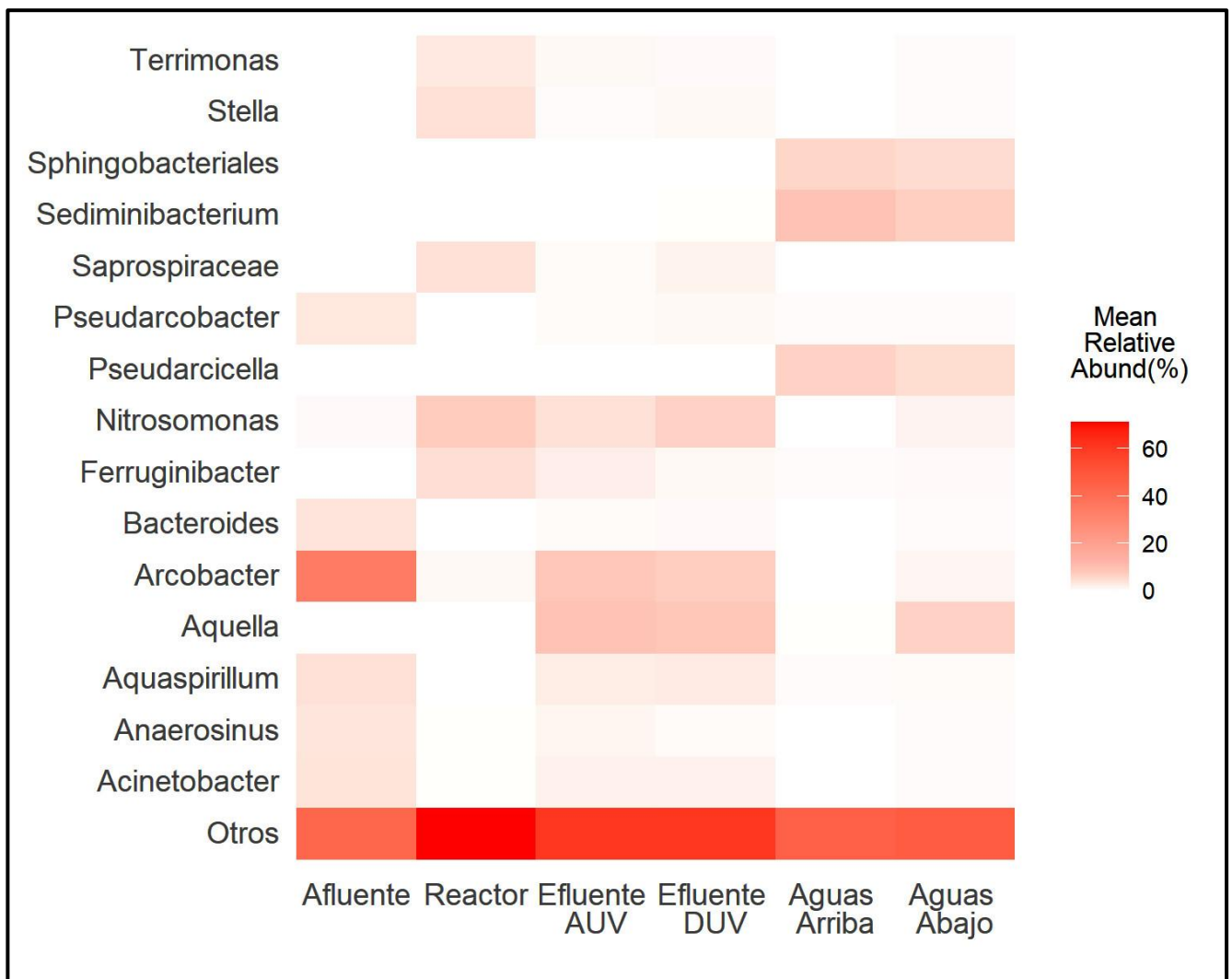


Figura 17. Análisis a nivel de género, o su nivel taxonómico más próximo, de los grupos predominantes en los diferentes puntos de muestreo. Aquí se muestra en abundancia relativa los géneros con mayor abundancia, los géneros con menor abundancia que 3% se agrupan en "otros".

En la figura 17 se muestra el análisis de las comunidades de los puntos de muestreo en un nivel taxonómico de género o el nivel taxonómico más próximo. El género dominante en los afluentes es *Arcobacter* (34%). Para los reactores, el género más abundante es *Nitrosomonas* (7.3%), para los efluentes AUV y DUV el género más representado es un género que está denominado como *Aquella* (8.9 y 8.3%). Para los cauces aguas arriba y aguas abajo el género más representado es *Sediminibacterium* (9.0 y 6.9%). Cuando se evaluó la presencia y abundancia relativa de los géneros bacterianos patógenos presentes en la tabla 1, sólo se detectaron cinco de ellos: *Escherichia-Shigella*,

Mycobacterium, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, todos ellos con un número muy bajo de lecturas (*reads*) (tabla S7) y presentes sólo en algunos puntos de muestreo.

5.8 Evaluación del secuenciado masivo dirigido a múltiples dianas (Ampliseq)

En la evaluación del panel de Ampliseq se comenzó utilizando las mismas muestras de ADN que se utilizaron para la secuenciación del gen ARNr 16S. Donde las muestras de los afluentes eran las que esperaríamos encontrar la mayor cantidad de patógenos. Se siguió el protocolo de amplificación para armar las librerías según el fabricante y no se obtuvieron productos de amplificación detectables. Para descartar la posibilidad de un falso negativo, dado que la amplificación del gen ARNr 16S no tuvo inconvenientes, se realizaron diferentes experimentos. Lo primero que probé fue utilizar controles positivos, ya que para las reacciones anteriores no se habían utilizado debido a los costos elevados de las bibliotecas y a las experiencias pasadas donde las bibliotecas se habían podido amplificar sin mayores inconvenientes.

Además de esto se procuró concentrar el ADN de las extracciones utilizando *SpeedVac* (*Thermo Fisher*) ya que la concentración de las muestras era baja. En este caso se repitieron las muestras de los afluentes y se agregó una muestra positiva que había sido utilizada anteriormente con este panel (González, 2020).

En ninguna de las muestras de las tres PTARs presentaron productos de amplificación (Fig 18B y C), mientras que los controles positivos generaron picos en los tamaños esperados (Fig 18A). Con estos resultados, se consideró la posibilidad de la presencia de inhibidores en los extractos y que estuvieran impidiendo la amplificación correspondiente. Para evaluar esto se llevó a cabo una nueva extracción de ADN con otra metodología a las muestras de los efluentes. Se emplearon las muestras correspondientes a los efluentes debido a que se consideró que estas presentan mayor interés en dilucidar si existían patógenos debido al riesgo por uso recreativo. Además, se consideró que serían las muestras con menor cantidad de compuestos inhibidores proveniente de la materia fecal. Con estas extracciones se realizaron diferentes análisis.

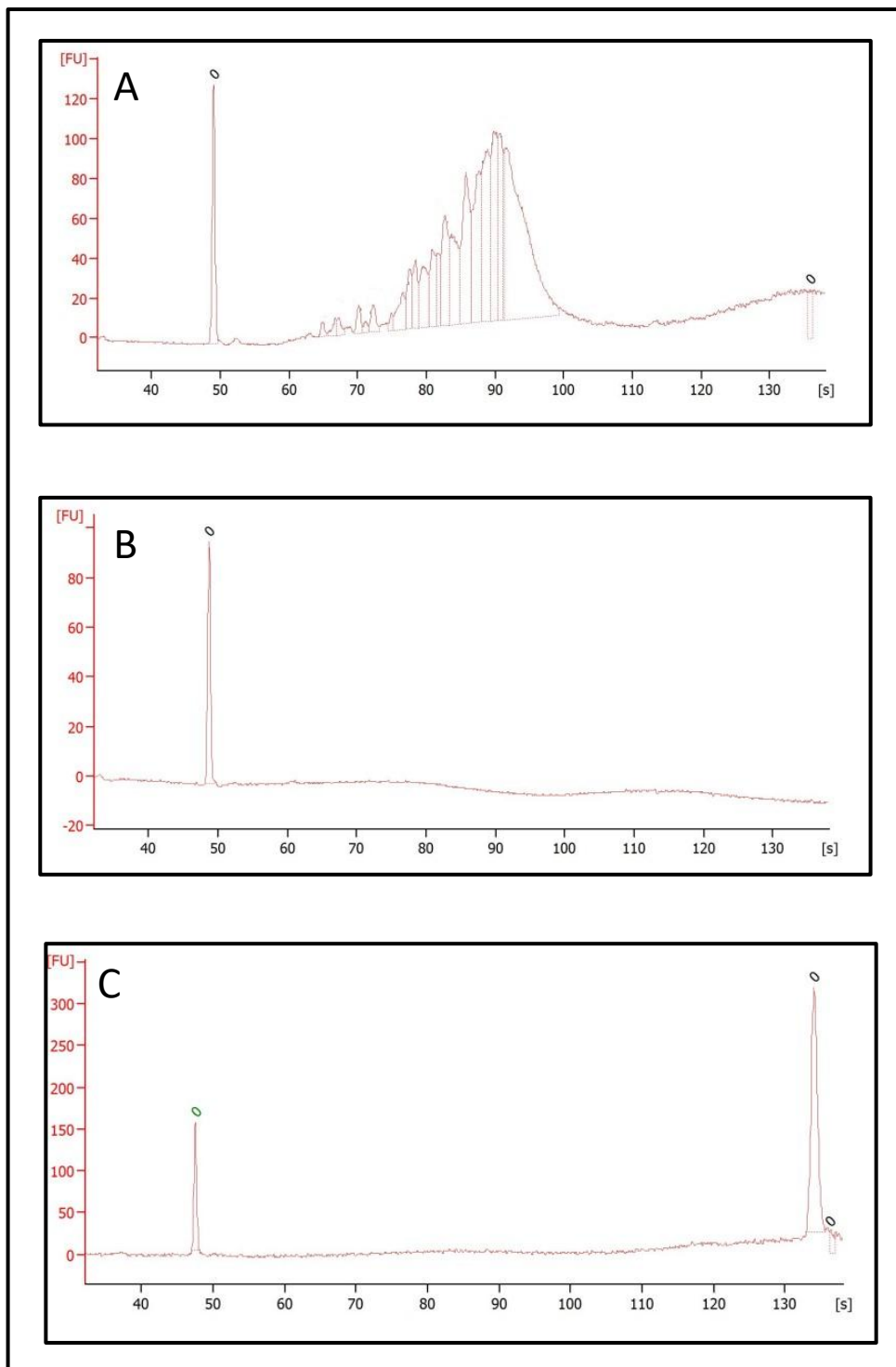


Figura 18. Comparación de amplificación de muestras control positivas con muestras problema.
Recuadro A: Amplificación de muestra positiva. **B:** amplificación de la muestra de los afluentes.
C: amplificación de la muestra de los afluentes concentrada.

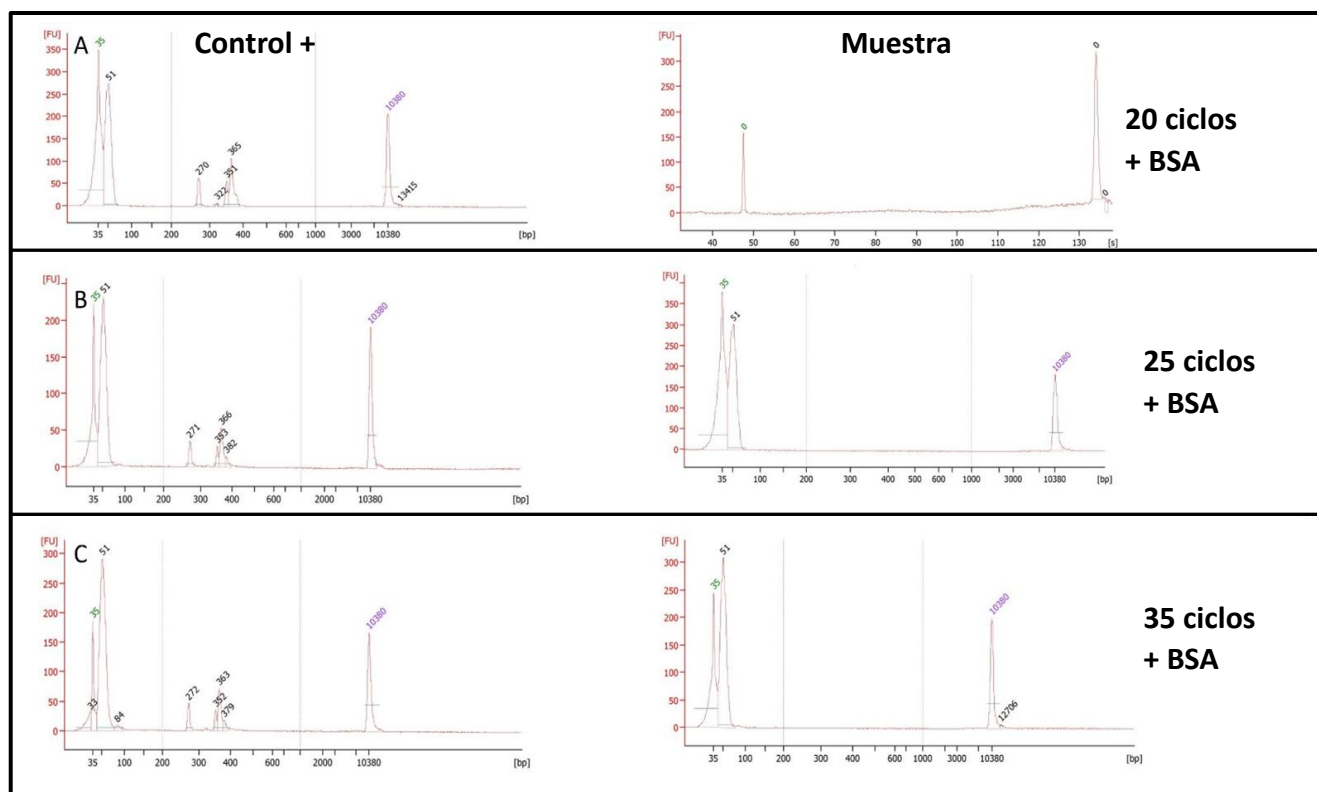


Figura 19. Pruebas efectuadas con la muestra control, con ADN positivo para patógenos utilizada en la tesis de González, 2020, y con el ADN obtenido de los efluentes de las plantas empleando diferentes ciclos de amplificación. Recuadro A: reacciones de PCR con 20 ciclos, a la izquierda muestras control positivo con picos del tamaño esperado; a la derecha se observan las muestras de los efluentes sin picos (únicamente se visualizan los picos correspondientes al estándar). B: amplificaciones realizadas empleando 25 ciclos. A la izquierda se muestra el control positivo con picos correspondientes a amplicones de genes de virulencia y a la derecha el resultado de la amplificación en muestras de los efluentes (no se observa amplificación). C: amplificaciones realizadas empleando 35 ciclos. A la izquierda se observa la muestra control positivo y a la derecha los resultados obtenidos con las muestras provenientes de reactores, que carecen de picos del tamaño esperado.

Con los resultados anteriores y pensando en secuestrar compuestos que pudieran estar inhibiendo la amplificación, se utilizó la proteína BSA en la reacción de PCR. A su vez, se disminuyó la cantidad de ADN molde para disminuir así los posibles inhibidores presentes en la muestra. Además, se fue aumentando la cantidad de ciclos de las PCR con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la reacción (ver figura 19). Nuevamente observamos que no hubo amplificación de los productos esperados para las muestras de las plantas y sí para las muestras control positivo (muestras con ADN patogénico utilizado en la tesis de González, 2020). Luego de este análisis se evaluó una forma alternativa para determinar la posible presencia de inhibidores. Para esto, se agregó un *spike in* de los controles positivos a las muestras de ADN de los efluentes que resultaron negativas, y se observó que al aumentar la cantidad de muestra problema existía interferencia con la amplificación del control positivo. Los resultados de este último análisis se observan en la Figura 20. En el recuadro A se muestra como amplifica una muestra positiva usada como control. En esta corrida se ven diferentes picos de diferentes genes virulencia. La muestra contiene varios ADNs de genes patogénicos amplificables del panel utilizado (Tabla 1). La intensidad de la señal para esta muestra se observa en el eje Y, y el valor del pico mayor es de alrededor 150 unidades de fluorescencia (FU). En la figura 20 recuadro B, la muestra positiva se mezcló con un pool

de muestras de los efluentes en una relación 1:1 (efluente: control positivo). En este caso podemos observar cómo nuevamente la muestra amplifica, observándose los mismos picos que en A, pero la intensidad de la señal del pico mayor disminuyó a aproximadamente 110 FU. En el recuadro C se muestra el resultado de volverá mezclar el *pool* de efluentes con la muestra positiva, pero en este caso en una relación de 4:1 (efluente: control positivo). En esta prueba nuevamente se observan picos en las mismas regiones que en los recuadros anteriores (figura 20 recuadro C), pero la intensidad de la señal es aún más baja, llegando aproximadamente a 70 FU. Esta caída observada de la fluorescencia en la amplificación de los productos en el control positivo podría ser consecuencia de una dilución de la concentración de la muestra control debido al agregado de la muestra de efluentes (a mayor cantidad de ADN de los efluentes, menor señal de las muestras control). Esto confirmaría que la ausencia de amplicones en las muestras de efluentes fue debida a la ausencia de genes blanco y no a la inhibición de la PCR.

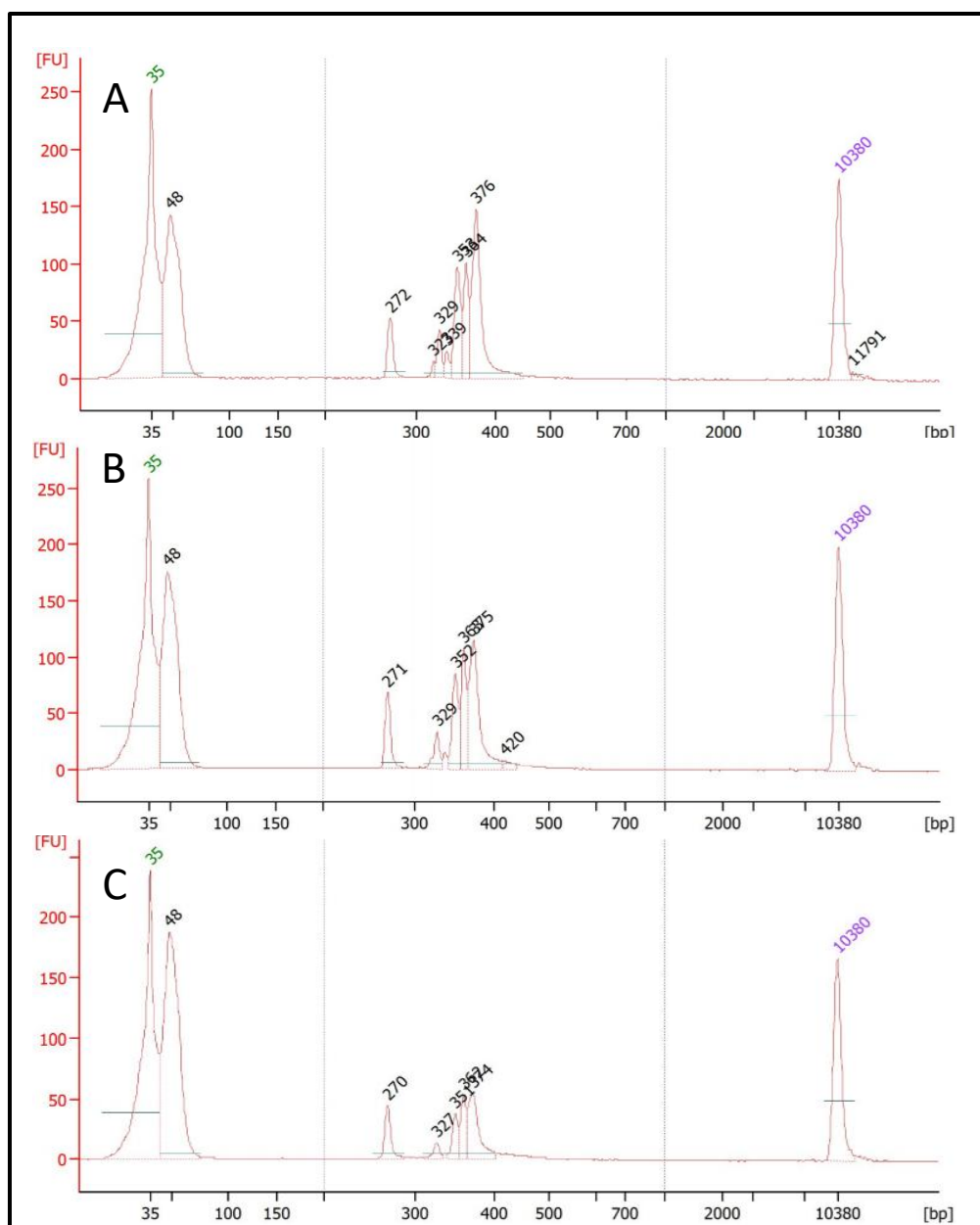


Figura 20. Análisis del control positivo mezclado en diferentes relaciones con la muestra de los efluentes. recuadro a, amplificación de la muestra control. Recuadro B: mezcla 1:1 de la muestra control con el pool de efluentes. recuadro C: mezcla 4:1 de la muestra control con el pool de efluentes. Se observa una disminución de fluorescencia de los picos de amplificación en los recuadros B y C.

6 Discusión

6.1 Herramientas de monitoreo actuales y moleculares para la evaluación de plantas de tratamiento de aguas residuales

Los resultados fisicoquímicos registrados en la tabla 5 muestran como en la mayoría de los casos las plantas remueven la materia orgánica y nutrientes con gran eficiencia, menos para el fósforo total de José Pedro Varela donde se ve un aumento en la concentración a la salida de la planta. El uso de compuestos químicos como el cloruro férrico para la precipitación del fósforo en el efluente es un método usado en plantas de lodos activados para mejorar la remoción de este nutriente (Zhang, 2015). La única planta de las estudiadas que utiliza este compuesto es Minas, donde efectivamente vemos como obtiene un descenso de fósforo en el efluente. En Treinta y Tres vemos un descenso importante de este nutriente sin utilizar cloruro férrico. Existe evidencia que en sistemas de tratamiento de aireación extendida es posible generar las condiciones para obtener una remoción biológica del fósforo (Datta, 2010), pero en este caso vemos que para las dos plantas de tratamiento con aireación extendida tenemos dos situaciones opuestas, con Treinta y Tres obteniendo una remoción de fósforo y José Pedro Varela con una nula eliminación de este nutriente. Estos datos contrastantes los podemos asociar a los datos moleculares. Si observamos los datos (tabla S8) y buscamos las bacterias acumuladoras de fosfatos (PAOs), responsables de eliminación de este compuesto, vemos que en el reactor de Treinta y Tres encontramos los géneros *Accumulibacter* y *Dechloromonas* pero en José Pedro Varela no vemos ningún género representado. Estas bacterias en la fase anaerobia del tratamiento consumen compuestos orgánicos solubles, como ácidos grasos volátiles y descomponen el polímero de polifosfato que tienen almacenado en sus células para obtener energía, liberando ortofosfatos en el medio. La energía generada a partir del polifosfato se utiliza para la acumulación de compuestos de carbono dentro de la célula en forma de poli-hidroxialcanoatos (PHA). En la fase aerobia, dentro del reactor, las PAOs utilizan los PHA almacenados como fuente de energía para tomar el fosfato que está libre en el agua y lo almacenan en forma de polifosfato dentro de sus células reduciendo así la cantidad de fósforo en el agua residual (Stokholm-Bjerregaard, 2017). Estos datos podrían estar indicando por qué obtenemos los resultados de remoción de fósforo y de un diferente manejo o condiciones de las dos plantas. Para los efluentes podemos observar que cumplen con la mayoría de los parámetros descritos en la normativa nacional, decreto 253/79 (tabla 2), para efluentes que descargan a cursos de agua. El único parámetro que no cumple con dicha normativa es el Amonio que en la planta de Treinta y Tres presentó un valor mayor al máximo permitido en el efluente el día de muestreo. Los datos de amonio en los efluentes pueden mostrar un problema en el tratamiento del agua residual. En plantas de lodos activados la remoción del amonio se da a través de procesos microbiológicos, donde las bacterias nitrificantes primero oxidan el amonio a nitrito y luego a nitrato; para que luego las bacterias desnitrificantes metabolicen los nitratos a nitrógeno gaseoso en condiciones anóxicas. Una baja en la eficiencia de la metabolización del amonio en el sistema puede indicar cambios en la planta de agua

residual y cambios en las comunidades de los reactores (Chen, 2016). Al observar los valores (tabla S8 anexo) de las bacterias nitrificantes notamos que Treinta y Tres tiene presencia de bacterias nitrificantes, aunque es la planta con menor abundancia relativa de las tres. Para las bacterias desnitrificantes podemos ver que José Pedro Varela es la de menor abundancia relativa. Además de esto tanto en Minas como en José Pedro Varela observamos en los análisis la presencia de un solo género reconocido como desnitrificante *Zooglea*, mientras que para Treinta y Tres observamos *Rhodoferrax*, *Rhodobacter*, *Thauera* y *Zooglea* (tabla S8). Estos datos podrían inferir una correlación de una baja cantidad de bacterias del ciclo del nitrógeno con una baja oxidación del amonio para Treinta y Tres y el alto contenido de nitratos en el efluente de José Pedro Varela debido a la baja desnitrificación (tabla 5). Sin embargo, para el caso de Treinta y Tres al chequear los datos históricos de amonio del efluente (Anexo Tabla S5) se puede corroborar que en la mayoría de los casos los valores son bajos, con la mayoría de los datos menores a 1 mg/L – N, lo cual cumple con la normativa (tabla 2). Estos datos de la tabla podrían indicar que el aumento del contenido de amonio en el efluente es un caso puntual posiblemente por alguna alteración en las condiciones del tratamiento de la planta, como puede ser un aumento de caudal puntual debido a lluvias o una baja de la cantidad de sólidos suspendidos en el reactor, y no de la comunidad. Para el caso de José Pedro Varela, si miramos el histórico de los datos de NO₃ en el efluente vemos que sistemáticamente tiene valores altos de este compuesto (Tabla S6). Esto puede ser debido a lo comentado anteriormente de la baja cantidad de bacterias desnitrificantes en la comunidad y también probablemente esto este asociado a un problema en el manejo de la planta. Para que se dé la desnitrificación es necesario condiciones específicas con una recirculación del licor de mezcla al reactor anóxico y una mezcla con el afluente. En estas condiciones y con un tiempo de residencia adecuado se produce la desnitrificación (Metcalf & Eddy, 1998). En cuanto a los datos de los indicadores microbiológicos, estos muestran cómo los efluentes, luego de la desinfección, bajan la carga microbiológica en la mayoría de los casos a niveles muy por debajo del máximo permitido en la normativa. En varios estudios se documentó la efectividad de diferentes dosis de UV para la desinfección de *E. Coli* en efluentes de plantas de lodos activados (Lazarotto, 2022; Adhikari, 2020; Campos, 2013).

En relación con la efectividad de la desinfección, se puede notar como la transmitancia está asociada a la carga microbiológica y a la efectividad de la desinfección, siendo José Pedro Varela la localidad donde se observa mejor. En episodios de baja transmitancia debido a un aumento de sólidos suspendidos en los efluentes, está estudiado que la carga microbiológica aumenta antes y después de la desinfección UV (Carré, 2018), esto demuestra la importancia de la transmitancia como indicador de la efectividad de la desinfección de los rayos UV. Esto no es tan evidente en las plantas de Minas y Treinta y Tres donde se observa en diferentes muestreos una baja en la transmitancia acompañado de un aumento en la carga microbiológica en el efluente antes de UV, pero luego de la desinfección la carga disminuye (Figura 7).

En algunos casos es posible que el tamaño de los sólidos suspendidos esté influenciando la desinfección, las partículas grandes en los efluentes son las que actúan dispersando los rayos UV y albergando bacterias, cuanto mayor el tamaño de las partículas menor será el poder de desinfección del UV (Carré, 2018). Esta característica de los sólidos

juega un papel importante en eficiencia de los rayos UV para la desinfección. Por otro lado, la desinfección también puede estar afectada por dosis de UV utilizada, cuanto mayor la dosis más grande es desinfección (Adhikari, 2020). Esto puede ser lo que sucede en Minas y Treinta y Tres donde vemos que las dosis usadas de UV son suficientes como para contrarrestar el efecto de la baja transmitancia. La baja de la carga microbiológica con una baja transmitancia demuestra una mayor resiliencia de las plantas de Minas y Treinta y Tres a cambios en la operativa de la planta.

En promedio las transmitancias de Minas y Treinta y Tres son superiores a la transmitancia promedio de José Pedro Varela (Figura 7), es decir que estas plantas entregan un efluente más clarificado que la planta de José Pedro Varela. Esto puede deberse a la diferencia en el diseño de las plantas. JPV es la única planta de las tres con un sistema mecánico de aireación del agua que en la actualidad se encuentra trabajando con un solo aireador por zanja. En algunos sedimentadores se da la existencia de flóculos pequeños que no sedimentan, o demoran más de lo estimado en sedimentar, esto puede generar una reducción en la transmitancia (EWA, 2006). Es posible que una diferencia en el tratamiento esté generando estos valores de transmitancia mayores para la planta de José Pedro Varela. Otra de las posibles causas de esta mayor transmitancia es una baja oxigenación en el reactor, esto puede generar episodios de bulking en las plantas (Guo, 2014) generando problemas de sedimentación en los sedimentadores. Como ya se comentó antes, José Pedro Varela al momento se encuentra trabajando con un solo aireador, esta no es la condición de diseño de las zanjas y es probable que el la oxigenación del reactor no sea la adecuada. Además de esto, José Pedro Varela es una planta que no utiliza cloruro férrico para la precipitación de fósforo, este compuesto está estudiado que a su vez de precipitar el fósforo participa precipitando contaminantes que aumentan la transmitancia de los efluentes (Umar, 2016).

Con los datos obtenidos en José Pedro Varela se puede llegar a considerar que sería posible establecer un sistema de alerta temprana observando la transmitancia de la planta para casos de incumplimientos bacteriológicos. En donde podemos decir que si el efluente de la planta tiene valores menores de 40% de transmitancia es probable que exista un incumplimiento bacteriológico.

Para la realización de los análisis de las comunidades a través de datos moleculares se tuvo que extraer ADN. La calidad y cantidad de ADN de las muestras varió, esto puede deberse a los diferentes métodos de muestreo y de extracción, etc. (Videnska, 2019; Thomas, 2015). Todavía no existe un consenso sobre la mejor forma de obtener ADN de muestras complejas como las de aguas residuales, aunque esto es esencial para la robustez y reproducibilidad de los análisis (Videnska, 2019). En este trabajo la evaluación de las extracciones nos permite ver diferencias entre los dos métodos utilizados. La extracción utilizando el kit de MOBIO Powersoil realizado en el CURE entregó resultados de calidad y cantidad inferiores a los resultados obtenidos de la extracción en el Clemente Estable según Deus et al. (2020). Las relaciones de absorbancia varían entre las extracciones con una notoria mejoría en la relación de 260/230 en la última extracción. Altos valores de este índice se pueden deber a compuestos que comúnmente se encuentran en muestras complejas como las utilizadas en este estudio.

La extracción por el método descrito en Deus et al. (2020) utiliza el equipo *FastPrep* (MP Biomedicals) para romper las células en las muestras. La intensidad del vortex utilizado en la extracción con kit Powersoil realizado en el CURE no tiene la misma potencia. Esta es una diferencia que puede relacionarse a una de las razones por la cual se obtuvo una menor cantidad de ADN en la extracción realizado en el CURE. En bibliografía se remarca esta diferencia y se habla de que se necesitan mayores tiempos de agitación en los vortex para obtener resultados similares (Totty, 2016). Otra diferencia es la utilización de cloroformo para la extracción, en los kits comerciales el uso de este compuesto se dejó de utilizar debido a su toxicidad. Existe evidencia que las extracciones con este compuesto dan mejores resultados de cantidad y calidad del ADN extraído (Silva, 2020).

6.2 Caracterización de los cambios en la estructura comunitaria del agua residual en las plantas de tratamiento

Al evaluar las comunidad de los puntos de muestreos vemos que para los afluentes el filo más abundante es *Campylobacterota* (Figura 16), este filo contiene muchas bacterias que viven en los intestinos de los animales y muchas son patógenas para los humanos. Una de las especies más conocidas es *Helicobacter pylori*, esta puede invadir el estómago humano y generar úlceras (van der Stel, 2019), otras especies patogénicas conocidas son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, estas especies están estudiadas como las causantes de la mayoría de los casos de gastroenterocolitis transmitida por los alimentos en el mundo (Rzeznitzeck, 2022). Al entrar a los reactores vemos como este filo casi desaparece con un aumento notorio del filo *Bacteroidota* (Figura 16). La mayoría de las bacterias del filo *Campylobacterota* son especies microaerófilas, por lo cual es de esperar que al ingresar a los reactores aerobios se vean desplazadas de la comunidad por bacterias que se adaptan mejor a un ambiente aerobio (Zhang, 2023). La diversidad es una de las propiedades ecológicas más ampliamente estudiadas. Se informa extensamente y a menudo se promueve como un indicador del estado del ecosistema debido a sus relaciones con la productividad, el funcionamiento y la estabilidad (Reese, 2018). Al evaluar la diversidad alfa en los afluentes vemos que estos tienen la menor riqueza, junto a los cauces aguas arriba y estos se diferencian del resto de los puntos (Figura 10), los afluentes también son los puntos menos diversos y los menos equitativos del conjunto de muestras (Figuras 11, 12 y 13). Una comunidad con estas características normalmente está asociada a un ecosistema específico y en este caso es esperable encontrar una comunidad asociada a la comunidad entérica de los seres humanos debido a ser agua residual doméstica. Las aguas residuales domésticas sin tratar pueden representar de manera efectiva una muestra fecal compuesta de una población que vive en la misma área de captación. Estas aguas eliminan las diferencias individuales y proporcionan un método para evaluar la comunidad microbiana intestinal de una población (Wu, 2024). La comunidad de bacterias en los intestinos de los humanos está compuesta principalmente por anaerobios estrictos, que superan en número a los anaerobios facultativos, y a los aerobios en hasta 100 veces (Bull, 2014). Aunque se ha detectado la presencia de más

de 50 filos en el intestino humano, la microbiota está dominada por solo 2 filos: *Bacteroidota* y *Bacillota* (Bull, 2014). Los géneros más predominantes de estos filos son *Lactobacillae*, *Streptococci* y *Enterobacteria* (Hou, 2022). En este trabajo vimos que los filos predominantes en los afluentes son *Campylobacterota*, y en menor medida *Pseudomonadota* y *Bacillota* (Fig. 16), esto no condice con los filos predominantes en los intestinos de los seres humanos, pero si lo hace con lo reportado para agua residual cruda en bibliografía (Qin, 2023; Begmatov, 2024). Esta diferencia puede estar dada debido a que las condiciones en las aguas residuales son muy variables, con fluctuaciones en oxígeno, pH, temperatura y composición química, lo que da lugar a una comunidad microbiana con otra diversidad y , mayor adaptabilidad (Shanks, 2013). Varios artículos publicados muestran que los afluentes son los puntos donde la diversidad y la riqueza son menores y luego dentro de las plantas la diversidad aumenta (Oluseyi, 2019, Plaza, 2021). Los datos de diversidad alfa también nos muestran que los afluentes son los puntos de menor equitatividad de todas las muestras (figura 13). En estos puntos podemos decir que algunas bacterias están en mayores proporciones que el resto y dominan la comunidad. Teniendo en cuenta estos datos observamos la diversidad beta y vemos que existe una diferencia significativa entre las comunidades de los afluentes y la de los reactores (Tabla 7). Para evaluar cuáles son las especies que dan cuenta de esta diferencia significativa entre las comunidades utilizamos el análisis SIMPER que se muestra en las tablas 8, 9 y 10, y en la figura 15. Para el análisis de los afluentes con los reactores vemos que una sola especie contribuye casi un 17% en la diferenciación de estos dos puntos. Esta especie se encuentra básicamente en los afluentes y en muy baja cantidad en los reactores. La especie es *Arcobacter* midas s2255, este género se encuentra dentro del filo *Campylobacterota*. La diferencia con esta bacteria también la vemos en la figura 17 donde *Arcobacter* muestra la mayor abundancia relativa en los afluentes. En la figura 15 A, vemos como el género *Arcobacter* es desplazado cuando llega a los reactores. Esto, como se comentó antes, puede estar asociado a que las bacterias presentes en el reactor están adaptadas a nichos ecológicos específicos dentro del sistema y los patógenos, como *Arcobacter*, generalmente no están adaptados a estos nichos y no pueden establecerse tan fácilmente. (Lee, 2015). El género *Arcobacter* comprende actualmente 30 especies. Estas tienen una amplia distribución en huéspedes humanos y animales y habitan varios ecosistemas. Las especies de *Arcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* son reconocidas como enteropatógenos humanos y como posibles agentes zoonóticos. Este género es considerado como un patógeno alimentario emergente (Mudadu, 2021).

Las comunidades bacterianas observadas en los reactores de lodos activados pueden considerarse comunidades abiertas en las que la inmigración y emigración de bacterias ocurren continuamente. Un reactor de lodos activados puede verse como un espacio que contiene una comunidad bacteriana local, y las aguas residuales que entran a la planta son una fuente de especies bacterianas que inmigran al mismo. La influencia del flujo de diversas especies bacterianas en las dinámicas temporales de las comunidades bacterianas del reactor puede explicarse mediante procesos de nicho (Lee, 2015). Un nicho bacteriano se refiere al entorno específico en el que vive y prospera una población de bacterias. Este concepto incluye varios factores, como las condiciones físicas y

químicas del entorno, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de otras especies (Lee, 2015). En la comunidad de los reactores los filos más destacados son *Pseudomonadota* y *Bacteroidota* (figura 16) y dentro de los géneros destaca *Nitrosomonas* (Figura 17), este es el género de mayor abundancia en los reactores con un 7,3 % y lo podemos encontrar tanto en los reactores como en los efluentes. Es esperable encontrarlo en los reactores debido a la función que cumple en las plantas, ya que estas bacterias cumplen el rol de oxidar el amonio a nitrito, existe amplia evidencia que actúan en lodos activados cumpliendo estos roles (Gernaey, 1997; Beaumont, 2004). Aunque no es esperable encontrarlo siendo el grupo mayoritario de un reactor, las bacterias de las comunidades nitrificantes se encuentran normalmente con una abundancia del 1 al 5% en plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas (Yu, 2018). Es posible que el tratamiento de los lodos, siendo dos de las tres plantas en este estudio de aireación extendida, tenga un efecto en la composición de la comunidad. Existe evidencia que muestra que mayores tiempos de retención de los sólidos mejora la oxidación del amonio en las plantas y aumenta la cantidad de bacterias nitrificantes (Waheed, 2013). En Dueholm, 2022, se estudiaron más de 700 plantas de lodos activados y encontraron la existencia de ciertos géneros de bacterias que se agrupan de tres formas: un núcleo estricto, donde los géneros de este grupo se encuentran en más del 80% de las plantas, un núcleo general, donde los géneros se encuentran en al menos en un 50% de las plantas y un núcleo débil, donde los géneros presentes están en un 20% de las plantas. Además de esto también estudiaron el porcentaje de las abundancias relativas de estas bacterias en las diferentes plantas. Si observamos los géneros y las abundancias relativas del núcleo estricto encontramos que todos los géneros están representados en este estudio (tabla S8 anexo), la mayoría de estos géneros están con menor abundancia relativa, menos los géneros *Ferruginibacter* y *Terrimonas* los cuales se encuentran con mayor abundancia que lo reportado en Dueholm 2022. Para el núcleo general cinco géneros no se encontraron en este trabajo y la mayoría del resto de los géneros encontrados están presentes en menor abundancia relativa que lo reportado en Dueholm, 2022 (tabla S8 anexo). Los géneros *Nitrosomonas*, *Thauera*, *Villigracilis*, *AAP99*, *Ahniella*, *midas_g_729*, *Haliscomenobacter*, *midas_g_679* se encuentran con mayor abundancia relativa que lo reportado en Dueholm, 2022 (tabla S8 anexo). En cuanto a las bacterias filamentosas encontramos en los reactores *Ca. Microthrix*, *Leptothrix*, *Trichococcus*, *Ca. Villigracilis*, *Sphaerotilus*, *Thiothrix*, *Gordonia*, *Nocardioides*, *Kouleothrix*, *Ca. Alysiosphaera*, *midas_g_1668*, *midas_g_105* y *Beggiatoa*, todos estos géneros fueron encontrados con valores de abundancia relativa menores al 1%. En este trabajo también se encontraron géneros de bacterias con metabolismos especiales, como pueden ser *Dechloromonas* y *Accumulibacter*, estas bacterias son acumuladoras de polifosfatos y se utilizan para la reducción del fósforo de los efluentes (Ruiz-Haddad, 2024). La abundancia relativa de estos géneros es menor que 3% por lo que quedan agrupados en “otros” en la figura 17. Las comunidades bacterianas de los reactores están dominadas por bacterias aeróbicas y facultativas anaeróbicas capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos. Lo cual las vuelve esenciales para el tratamiento eficiente de las aguas residuales en las plantas de tratamiento (Qin, 2018). La diversidad Alfa mostró un aumento de la riqueza, la

diversidad y la equitatividad en los reactores (figura 10, 11 y 13) con respecto a los afluentes. Estos valores se mantienen elevados dentro de las plantas. Por otro lado, la diversidad beta a través del análisis de ANOSIM demostró que existe una diferencia significativa entre las comunidades de los reactores con la de los afluentes y con las de aguas arriba y aguas abajo (tabla 8, 9 y 10). Este análisis muestra que dentro de las plantas se generan comunidades que se diferencian a lo que entra a la planta y de lo que está en los cauces receptores. En este lugar las bacterias con mejor desempeño proliferan y generan una comunidad que perdura y que se enriquece con el paso del tiempo de especies nuevas que incorporan atributos específicos que permiten mejorar la resiliencia de la comunidad (Oluseyi, 2019, Plaza, 2021). Los análisis SIMPER de los reactores con los cauces no mostraron ningún género o especie que domine la diferencia como ocurrió con el SIMPER de los afluentes con los reactores. En cambio, vemos que para los cauces las mayores contribuciones a la diferencia de los puntos rondan en un uno por ciento. Es decir que, si bien existe una diferencia significativa entre estos puntos, la diferencia es más homogénea que en el caso anterior, las comunidades son diferentes, pero la diferencia no está dominada por una especie como en el caso de los afluentes (figura 15). Existen muchos ASVs con poco peso contributivo que están presentes en los reactores, pero no así en los cauces y viceversa, esto genera suficiente peso acumulativo finalmente para obtener una diferencia significativa. Esto se puede observar de mejor manera en la figura 14. En esta figura vemos cómo se agrupan las comunidades de los puntos de muestreo. A través del NMDS pudimos observar lo que el ANOSIM mostraba, cómo las comunidades de los reactores se encuentran alejadas de los cauces receptores y de los afluentes. A su vez se observa como los efluentes y los reactores se solapan entre ellos, demostrando que sus comunidades son similares. Esta figura nos permite mostrar como los reactores juegan un rol predominante en cómo va a estar configurada las comunidades de las plantas.

Las comunidades de los efluentes son similares antes y después de UV (figura 16), esto es esperable ya que la desinfección actúa reduciendo la cantidad de microorganismos presentes en las muestras, pero no elimina por completo a las especies bacterianas (Yang, 2022). Lo que podemos ver entre los efluentes antes y después de la desinfección es un pequeño aumento en el filo *Actinobacteria* y una disminución en los *Bacteroidota* (figura 16). Esto puede ser debido a lo reportado en Yang, 2022 sobre una mayor resistencia de las *Actinobacterias* a la desinfección por UV y de una baja resistencia a la radiación de los *Bacteroidota*. En los efluentes los géneros más abundantes son *Aquella* sp. 8,8 % y *Arcobacter* 8,2% (figura 17). Estos géneros luego de la desinfección por UV vemos que mantienen una abundancia relativa muy similar. *Arcobacter* disminuye su abundancia relativa en los reactores donde la comunidad es muy amplia, pero al pasar por los procesos de tratamiento de decantación y desinfección, donde la riqueza de las poblaciones disminuye (Oluseyi, 2019), volvemos a encontrar *Arcobacter*.

6.3 Incidencia de los efluentes en los cauces receptores

Para los cauces receptores vemos la aparición en baja cantidad del filo *Cyanobacteria* tanto para aguas arriba como para aguas abajo, lo cual es esperable ya que estos cauces son agua superficial y las cianobacterias normalmente se encuentran presente en estos cuerpos de agua (Martínez de la Escalera, 2017). Si observamos el cauce aguas abajo podemos ver la aparición del filo *Campylobacterota* el cual no se encuentra en el cauce aguas arriba. Este tiene muchas especies asociadas a los intestinos de los seres humanos y animales como anteriormente se expresó. También podemos decir lo mismo con el aumento de las *Pseudomonadota*, este filo es el mayoritario en las plantas de tratamiento y vemos como aumenta aguas abajo mostrando lo que podría ser un impacto en los cauces receptores (Qin, 2019). Esto lo podemos inferir también con datos fisicoquímicos clásicos o bacteriológicos que se muestran en la tabla 5, en la imagen 7 y en las tablas de los anexos S2, S3 y S4, donde se observa como los efluentes contienen carga microbiológica y de nutrientes importante que se ve reflejada en el cauce al ser vertido. Existe evidencia en diferentes estudios donde se observa el impacto del vertido de efluentes en los cauces, con cambios en las comunidades bacterianas y con disminución de la diversidad de las comunidades planctónicas (Wang, 2022). Si observamos los géneros más representados vemos que, tanto aguas arriba como aguas abajo, los géneros *Sediminibacterium*, *Pseudarcicella* y midas 15175 con altas abundancias relativas, este último es un género no identificado del orden *Sphingobacteriales*. Es esperable encontrar estos géneros en los cauces ya que son bacterias que viven en cuerpos de agua (Kang, 2014). Algunos autores presentan estos géneros como indicadores de buena calidad de agua (Guo, 2020). En los cauces aguas abajo, que son los cauces que reciben los efluentes tratados, vemos algunos géneros con una abundancia relativa significativa. *Arcobacter* 1,1%, *Nitrosomonas* 1,4% y *Aquella* sp. 6,3% son los más abundantes. Este último es un género nuevo para bacterias de la familia *Neisseriaceae* encontradas en agua. En los efluentes DUV las abundancias relativas de estos géneros fueron 7,2%, 6,2% y 8,3% respectivamente y en los cauces aguas arriba las abundancias fueron 0,08%, 0,04% y 0,18%. Estos datos muestran lo que podría ser un impacto del efluente de las plantas de tratamiento a los cauces receptores. Se esperaba encontrar estos géneros debido a que están presentes en gran abundancia dentro de las plantas, como fue expresado anteriormente en este trabajo y también por lo observado en otros trabajos (Mudadu, 2021, Beaumont, 2004). Al analizar la diversidad alfa los cauces receptores vemos que las muestras del cauce aguas arriba son puntos de baja riqueza y diversidad. Estas muestras, en comparación con los cauces aguas abajo tienen menor cantidad de especies presentes y menores índices de diversidad. Estos datos concuerdan con Plaza (2021), quien observó un aumento de diversidad en los cauces aguas abajo debido al impacto de los efluentes de las plantas. Para los cauces aguas abajo el aumento de diversidad y de riqueza puede ser un reflejo de la unión de las dos comunidades integrándose. Podemos notar en la figura 15 como los géneros *Nitrosomonas*, *Terrimonas* y *Ferruginibacter* que están específicamente en el reactor y no aparecen aguas arriba, aparecen luego en los cauces aguas abajo, evidenciando el impacto de los efluentes en los cauces, como fue mencionado

anteriormente y en el trabajo de Mudadu, 2021. El heatmap (figura 15) nos permite observar rápidamente cuales son los grupos taxonómicos más importantes en el impacto de los cauces por vertidos de efluentes. La diversidad beta nos muestra que las comunidades de los cauces se diferencian de las comunidades de las plantas (tabla 9 y 10), si bien el análisis SIMPER no muestra géneros o especies dominantes que diferencien las comunidades, si existen varios géneros con poco peso contributivo pero que sumados generan una diferencia significativa, como se mencionó anteriormente. Si miramos el análisis de NMDS (figura 14) vemos las comunidades de los cauces alejadas de las comunidades de la planta, pero se puede observar cómo los puntos de las comunidades de aguas abajo se encuentran más cercanos a las comunidades de la planta en comparación de los puntos de aguas arriba.

En síntesis, se observa como en la entrada, el afluente llega a la planta con su comunidad propia y al entrar a la planta, en los reactores, esta comunidad se ve asimilada por la comunidad de los reactores. Esta luego se mantiene en los efluentes donde se observa cómo después de la decantación de los lodos en el sedimentador el efluente clarificado sigue teniendo una comunidad relativamente similar a la de los reactores. En los cauces receptores se observa que presentan comunidades bacterianas características, significativamente diferentes a las de las plantas. Si observamos la bibliografía, podemos encontrar estudios con resultados similares a los de este trabajo. En Ríos, 2023 se muestran datos de ANOSIM y NMDS, donde observan, como aquí, que las comunidades de los afluentes tienen diferencias significativas con las comunidades de las plantas.

6.4 Evaluación de las comunidades patogénicas

Al utilizar la secuenciación del gen ARNr 16S para evaluar las bacterias de la tabla 1 vemos que no es posible discernir más allá de género (Janda, 2007; Johnson, 2019) y si vamos a ver los géneros de estas bacterias, observamos que están presentes con muy pocos reads (tabla S7). La baja cantidad de géneros encontrados de la tabla 1 puede corresponderse a que la comunidad patogénica dentro de la planta se encuentra en baja abundancia o bien como se comentó anteriormente no las estamos viendo. Para comprobar esto se realizó el análisis de secuenciado masivo a múltiples dianas. Este análisis cuenta con mayor sensibilidad (Gardner, 2015) ya que se centra en genes específicos de las bacterias patógenas y así permite dilucidar si existen estas bacterias patógenas en las muestras.

El panel Ampliseq de genes patogénicos utilizado mostró que, en las plantas de tratamiento estudiadas, no se encontraron los genes de las comunidades bacterianas buscadas. En principio se evaluaron los afluentes (figura 18) y luego los efluentes con una extracción de ADN diferente (Figura 19). En todos los casos las amplificaciones del panel fueron negativas. Al evaluar estos datos se pensó en la posibilidad de que las comunidades no se encuentren, o se encuentran en muy baja concentración, no permitiendo que el método utilizado las detecte debido al límite de cuantificación. Este panel de secuenciación se generó en González, 2020 y se comprobó la amplificación de

los genes patogénicos a una concentración estimada de hasta 30 genomas/ μ l aumentando los números de ciclos de amplificación. Demostrando que esta técnica es muy sensible. Existen artículos publicados que hablan de pruebas de paneles de genes específicos que amplifican en cantidades de hasta 10 genomas / μ l (Gardner, 2015). Otra hipótesis que se sugirió al no obtener resultados fue problemas en la creación de las bibliotecas, para evaluar esto se utilizó controles positivos en las amplificaciones y se adicionó a la muestra control un *spike in* de diferentes cantidades de muestra problema. En este caso se observó como el control continuaba amplificando, pero en menor medida cuanto mayor cantidad de muestra problema era adicionada (Figura 20). La muestra de los efluente diluyó el control positivo.

Normalmente los genes se encuentran en más de una copia, como pueden ser los genes de ARN ribosomal, lo que permite una fácil amplificación, pero en casos de genes de virulencia como los utilizados en este estudio, hay evidencia que la mayoría están presentes en bajas cantidades de copias en el genoma (Søborg, 2010). También está estudiado que las comunidades patogénicas disminuyen dentro de las plantas de tratamiento (Ríos, 2023) y además de esto se conoce que dentro de las comunidades bacterianas de aguas residuales las bacterias con genes patogénicos representan valores bajos de entre la población de bacterias (Cai, 2013). Esto, sumado a la baja cantidad de géneros potencialmente patógenos que vimos con el análisis del gen ARNr 16S (tabla S7) donde solo algunos géneros del panel fueron encontrados, nos permite proponer que, en las muestras estudiadas no se encuentran presente las bacterias patogénicas.

7. Consideraciones finales y perspectivas

Los datos generados a través del monitoreo fisicoquímico, bacteriológico y genómico de las plantas nos permiten decir que es posible establecer de forma preliminar, en particular para la planta de José Pedro Varela, un sistema de alerta temprana con un dato fisicoquímico como lo es la transmitancia. Este análisis nos permite inferir si existirá un incumplimiento bacteriológico con la visualización de la transmitancia del efluente. Para poder confirmar esto y utilizar este parámetro como alerta temprana es necesario un monitoreo más amplio de muestras.

Los resultados obtenidos para estas plantas permiten concluir que existen similitudes en la composición de las comunidades microbianas de estos sistemas de tratamiento, esto lo podemos observar al ver cómo se agrupan las réplicas en los análisis. En los afluentes, las comunidades llegan con la menor diversidad y al ingresar a los reactores las comunidades aumentan su diversidad, riqueza y equitatividad, ya que estos son reservorios de una gran cantidad de bacterias, muchas en bajas proporciones pero que en las condiciones adecuadas proliferan y prosperan. Otra cosa que pudimos observar es cómo estas comunidades diversas de los reactores llegan a los cauces receptores a través de los efluentes, aumentando la diversidad de los cauces. Estos son los resultados de este trabajo y también se vio resultados similares en otros trabajos citados, se plantea necesario el análisis en mayor cantidad de tiempo para mejorar y confirmar estos datos.

Los datos genómicos de las comunidades patogénicas evidencian que en los afluentes existen grupos de bacterias potencialmente patogénicas con un peso relativo importante, específicamente el género *Arcobacter* (fig. 15 y 17), pero este disminuye dentro de las plantas.

La búsqueda de bacterias patógenas de la tabla 1 a través del gen del ARNr 16S mostró baja cantidad de patógenos en los puntos de muestreo. Esto es posible que sea debido al bajo poder de resolución de esta metodología y a la baja cantidad de muestras en este estudio.

El secuenciado masivo dirigido a múltiples dianas permite confirmar que en las muestras de los efluentes de las plantas de tratamiento estudiadas no se encuentran las más de 24 especies bacterianas patógenas del panel (Tabla 1). Este panel de Ampliseq fue creado como una primera aproximación para un monitoreo de patógenos en aguas superficiales y es la primera vez que se utiliza en una matriz de aguas residuales en el país. Es deseable que con esta experiencia se pueda actualizar los genes específicos buscados para poder abarcar mejor los patógenos más relevantes en aguas residuales. Pensando en los resultados de este estudio y en los afluentes específicamente se podría agregar al panel genes específicos de las especies patogénicas del género *Arcobacter*.

Si bien la diversidad bacteriana encontrada en los reactores coincide con estudios internacionales, la ausencia de genes de virulencia detectada mediante AmpliSeq constituye un hallazgo relevante en el contexto uruguayo, ya que sugiere que el riesgo sanitario de estos efluentes podría ser menor al estimado con métodos convencionales

Como evaluación final se considera que este trabajo podría enriquecerse ampliando el monitoreo molecular, extendiendo el número de plantas y la cantidad de muestras, y de réplicas de los puntos de muestreo. También sería deseable mejorar las extracciones de ADN y el secuenciado, secuenciar tanto por marcadores específicos, como el del gen ARNr 16S, como por shotgun para poder evaluar todo el material genético de las muestras. Esto permitiría el estudio tanto de la diversidad y de la estructura de la comunidades de mejor manera como también el estudio de funciones metabólicas de la comunidad para evaluar las interacciones de los diferentes microorganismos y su capacidad de llenar nichos ecológicos diferentes. Además, se podría evaluar genes de resistencia a antibióticos para mejorar la determinación del riesgo asociado de los efluentes. Incluso con esta secuenciación se podría identificar rutas metabólicas con interés biotecnológico como la degradación de contaminantes que permita mejorar el desempeño de la operación de las plantas de tratamiento, o evaluar tratamientos novedosos de contaminantes específicos con la identificación de estas bacterias con vías metabólicas específicas.

Este estudio demuestra que el uso combinado de secuenciación de amplicones 16S y paneles dirigidos de genes de virulencia constituye una herramienta robusta para evaluar la seguridad sanitaria de efluentes domésticos. La incorporación de estos métodos al monitoreo rutinario de PTARs en Uruguay podría optimizar la vigilancia epidemiológica y mejorar la gestión ambiental.

8 Bibliografía

Abefase, J. 201. Manual de operación de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Canelones.

Adhikari, A., Parraga Estrada, K. J., Chhetri, V. S., Janes, M., Fontenot, K., & Beaulieu, J. C. (2020). Evaluation of ultraviolet (UV-C) light treatment for microbial inactivation in agricultural waters with different levels of turbidity. *Food Science & Nutrition*, 8(2), 1237-1243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1412>

Alhamlan, F. S., Al-Qahtani, A. A. and Al-Ahdal, M. N. 2015. "Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries," *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(2), pp. 128–135. <https://doi.org/10.3855/jidc.6101>

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Ashbolt, N. Grabow, W. Snozzi, M. 2001. Indicators of microbial water quality. World Health Organization (WHO). *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. IWA Publishing, London, UK. ISBN: 1 900222 28 0

Beaumont, H. J. E., Lens, S. I., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V., & van Spanning, R. J. M. 2004. Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor: NsrR regulation of NirK expression in *N. europaea*. *Molecular Microbiology*, 54(1), 148–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04248.x>

Begmatov, S., Beletsky, A. V., Dorofeev, A. G., Pimenov, N. V., Mardanov, A. V., & Ravin, N. V. (2024). Metagenomic insights into the wastewater resistome before and after purification at large-scale wastewater treatment plants in the Moscow city. *Scientific Reports*, 14(1), 6349. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56870-0>

Boon, N. De Windt, W. Verstraete, W. M. Top, E. 2001. Evaluation of nested PCR^DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* 39 (2002) 101^112

Bovio-Winkler, P. Cabezas, A. Etchebehere, C. 2020. Database mining to unravel the ecology of the phylum Chloroflexi in methanogenic full-scale bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 11, 603234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603234bovio>

Bovio-Winkler, P. Guerrero, L. Erijman, L. Oyarzúa, P. Suárez-Ojeda, M. Cabezas, A. Etchebehere, C. 2023. Genome-centric metagenomic insights into the role of Chloroflexi in anammox, activated sludge and methanogenic reactors. *BMC Microbiology*. 23, 45. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02765-5>

Bull, M. J., & Plummer, N. T. (2014). Part 1: The human gut microbiome in health and disease. Nih.gov. Recuperado el 7 de julio de 2024, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566439/pdf/17-22.pdf>

Cabrera, F. Iturralde, A, Lena, A. Saavedra, M. Cámara, M. García, L. González, T. Koziol, S. Acuña, A. Giachetto, G. 2017. Enteroparasitosis en niños de dos Centros de Atención a la Infancia y la Familia (CAIF) del barrio Casavalle, Montevideo. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 88(6), 315-321.

Cai, L., & Zhang, T. 2013. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 5433–5441. <https://doi.org/10.1021/es400275r>

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*
Chen, Y., Xiong, C., & Nie, J. (2016). Removal of ammonia nitrogen from wastewater using modified activated sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1), 419–425. <https://doi.org/10.15244/pjoes/60859>

Campos, C. Avant, J. Lowther, J. Till, D. Lees, D. 2013. Levels of Norovirus and E. coli in Untreated, Biologically Treated and UV-Disinfected Sewage Effluent Discharged to a Shellfish Water. *Journal of Water Resource and Protection*, 2013, 5, 978-982

Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., & Lopez-Ferber, M. (2018). Impact of suspended particles on UV disinfection of activated-sludge effluent with the aim of reclamation. *Journal of Water Process Engineering*, 22, 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.01.016>

Chen, H., Wei, Y., Liang, P., Wang, C., Hu, Y., Xie, M., Wang, Y., Xiao, B., Du, C., & Tian, H. (2020). Performance and microbial community variations of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for treating monosodium glutamate wastewater: Effects of organic loading rate. *Journal of Environmental Management*, 253(109691), 109691.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109691>

Claesson, M. Wang, Q. O’Sullivan, O. Greene-Diniz, R. Cole, J. Ross, R.P. O’Toole, P. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, No. 22.

Collier, S. A. et al. 2012. “Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water,” *Epidemiology and Infection*, 140(11), pp. 2003–2013. doi: 10.1017/S0950268811002858.

De Schampelaire, L., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M. W., Boon, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial community analysis of anodes from sediment microbial fuel cells powered by rhizodeposits of living rice plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 2002–2008. <https://doi.org/10.1128/AEM.02432-09>

- Deus, S. Kruk, C. Martínez, G. Montes, M. Segura, A. Piccini, C. 2020. Morphology captures toxicity in *Microcystis aeruginosa* complex: Evidence from a wide environmental gradient. *Harmful Algae* 97 (2020) 101854. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101854>
- 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.
- Elmfro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559–570. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.559>
- EPA. 1999. Wastewater Technology Fact Sheet, Ultraviolet Desinfection.
- Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., Giménez, M., D'Alessandro, B., Afshinnekoo, E., Mason, C., Gonnet, G. H., & Iraola, G. (2019). Urban metagenomics uncovers antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome*, 7(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0648-z>
- Fuess, L. T., Eng, F., Bovio-Winkler, P., Etchebehere, C., Zaiat, M., & Nascimento, C. A. O. do. (2022). Methanogenic consortia from thermophilic molasses-fed structured-bed reactors: microbial characterization and responses to varying food-to-microorganism ratios. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00291-x>
- Gajardo R., Pinto R. M. and Bosch A. 1995. Polymerase chain reaction amplification and typing of Rotavirus in environmental samples. *Water Sci. Technol.* 31, 371± 374.
- Gardner, S. N. *et al.* 2015. Targeted amplification for enhanced detection of biothreat agents by next-generation sequencing. *BMC Research Notes*. BioMed Central, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13104-015-1530-0.
- Gernaey, K., Vanrolleghem, P., & Verstraete, W. 1998. On-line estimation of *Nitrosomonas* kinetic parameters in activated sludge samples using titration in-sensor-experiments. *Water Research*, 32(1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(97\)00185-1](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(97)00185-1)
- Gilbert, J. A., Meyer, F., Jansson, J., Gordon, J., Pace, N., Tiedje, J., Ley, R., Fierer, N., Field, D., Kyrpides, N., Glöckner, F.-O., Klenk, H.-P., Wommack, K. E., Glass, E., Docherty, K., Gallery, R., Stevens, R., & Knight, R. (2010). The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “1 EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6, 2010. *Standards in Genomic Sciences*, 3(3), 249–253. <https://doi.org/10.4056/aigs.1443528>
- Giovannoni S. 1991. The polymerase chain reaction. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, eds E. Stackebrandt and M. Goodfellow, pp. 177±204. John Wiley and Sons, West Sussex England.

González, A. 2020. Generación de métodos basados en genómica para detectar microorganismos nocivos en sistemas acuáticos. Tesis de maestría en Biotecnología. Facultad de ciencias, Udelar.

Griffero, L., Alcántara-Durán, J., Alonso, C., Rodríguez-Gallego, L., Moreno-González, D., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., & Pérez-Parada, A. (2019). Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons. *The Science of the Total Environment*, 697(134058), 134058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134058>

Guo, D., Liang, J., Chen, W., Wang, J., Ji, B., & Luo, S. 2020. Bacterial community analysis of two neighboring freshwater lakes originating from one lake. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(1), 111–117. <https://doi.org/10.15244/pjoes/119094>

Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Yang, X., & Yuan, Z. (2014). Filamentous and non-filamentous bulking of activated sludge encountered under nutrients limitation or deficiency conditions. *Chemical Engineering Journal* (Lausanne, Switzerland: 1996), 255, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.075>

Guo, F., & Zhang, T. (2012). Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water Research*, 46(8), 2772–2782. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.039>

Halmich, C. Gehr, R. 2010 Effect of pre- and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents. *water research* 44, 2885–2893

Hammer, Ø., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: paquete de programas de estadística paleontológica para enseñanza y análisis de datos. *Palaeontol. Electrón*, 4(1), 4.

Hassen, A. Mahrouk, M. Ouzari, H. Cherif, M. Boudabous, A. Damelinourt, J.J. 2000. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Technology* 74, 141-150.

Heck, N., Freudenthal, J., & Dumack, K. (2023). Microeukaryotic predators shape the wastewater microbiome. *En bioRxiv* (p. 2023.04.04.535543). <https://doi.org/10.1101/2023.04.04.535543>

Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. L., & Arvin, E. 2008. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. Springer Science & Business Media.

Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>

Irigoin, P. Juanena, J.M. 2018. Pinceladas de algunas necesidades básicas en el Uruguay. Cinap.

- Janda, J. M., & Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jenkins D., Richard M.G. and Daigger G. 1993 *Manual of the control of activated sludge bulking and foaming*, 2nd edition, Lewis Publisher, Michigan.
- Johnston, J., & Behrens, S. (2020). Seasonal dynamics of the activated sludge microbiome in sequencing batch reactors, assessed using 16S rRNA transcript amplicon sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.00597-20>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kang, H., Kim, H., Lee, B.-I., Joung, Y., & Joh, K. 2014. *Sediminibacterium goheungense* sp. nov., isolated from a freshwater reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 4), 1328–1333. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055137-0>
- Koch. R. 1876. The etiology of anthrax disease, based on the Evolutionary History of *Bacillus Anthracis*. Wollstein, Grand Duchy of Posen.
- Kwiatkowska, A. Zielinska, M. 2016. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems, *World J. Microbiol Biotechnol* 32, 66
- Lazarotto, J. S., Júnior, E. P. M., Medeiros, R. C., Volpatto, F., & Silvestri, S. (2022). Sanitary sewage disinfection with ultraviolet radiation and ultrasound. *International Journal of Environmental Science and Technology: IJEST*, 19(11), 11531-11538. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03764-7>
- Lee, S.-H., Kang, H.-J., & Park, H.-D. (2015). Influence of influent wastewater communities on temporal variation of activated sludge communities. *Water Research*, 73, 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.014>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Li, W., Turner, A., Aggarwal, P., Matter, A., Storvick, E., Arnett, D. K., & Broeckel, U. (2015). Comprehensive evaluation of Ampliseq transcriptome, a novel targeted whole transcriptome RNA sequencing method for global gene expression analysis. *BMC Genomics*, 16(1), 1069. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2270-1>

- Li, Z., Yu, J., Liu, J., Zhao, Y., & Li, J. 2015. Reducing excess sludge production in a full-scale activated sludge process treating municipal wastewater. *Bioresource Technology*, 190, 201-207.
- Liu, T., Schnürer, A., Björkmalm, J., Willquist, K., & Kreuger, E. (2020). Diversity and abundance of microbial communities in UASB reactors during methane production from hydrolyzed wheat straw and Lucerne. *Microorganisms*, 8(9), 1394.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091394>
- Lofrano, G; Brown, J, 2010. Wastewater management through the ages: A history of mankind. *Science of the Total Environment* 408, 5254–5264
- Lu, X. Zhang, X. Wang, Z. Huang, K. Wang, Y. Liang, W. Tan, Y. Liu, B. Tang, J. 2015. Bacterial Pathogens and Community Composition in Advanced Sewage Treatment Systems Revealed by Metagenomics Analysis Based on High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 10(5): e0125549. doi:10.1371/journal. phone.0125549.
- Malla, M. A., Dubey, A., Kumar, A., Yadav, S., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. 2018. Exploring the human microbiome: The potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Frontiers in Immunology*, 9, 2868.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>
- Mara, D. D., & Pearson, H. W. 1998. Design of small-scale wastewater treatment plants. World Health Organization.
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., & Piccini, C. 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*, 62, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>
- McIlroy, S. J., Saunders, A. M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A. A., Karst, S. M., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2015). MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2015, bav062. <https://doi.org/10.1093/database/bav062>
- Metcalf & Eddy, 1998. *Ingeniería de Aguas Residuales*. McGraw-Hill, Tercera edición.
- Mielczarek, A. T., Kragelund, C., Eriksen, P. S., & Nielsen, P. H. (2012). Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal. *Water Research*, 46(12), 3781–3795.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.009>
- Mudadu, A.G. Melillo, R. Salza, S. Mara, L. Marongiu, L. Piras, G. Spanu, C. Tedde, T. Fadda, A. Virgilio, S. Terrosu, G. 2021 “Detection of *Arcobacter* spp. in environmental and food samples collected in industrial and artisanal sheep’s milk cheese-making plants”. *Food Control* (126) 108100.

Nielsen, PH. Mielczarek, AT. Kragelund, C. et al. 2010. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res* 44:5070–5088

Nijhawan, A. Howard, G. 2022. Associations between climate variables and water quality in low- and middle-income countries: A scoping review. *Water Research* 210 (2022) 117996

Ofiteru, ID. Lunn, M. Curtis, TP. et al. 2010. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15345–15350

Official publication of the European water association (EWA) © EWA 2006. *Psu.edu*.
<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=9edb21ae98f6392026e7da31d2dab685ca1c7e5c>

Oliver, J. D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4):415-425.

Oluseyi Osunmakinde, C., Selvarajan, R., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. 2019. Profiling bacterial diversity and potential pathogens in wastewater treatment plants using high-throughput sequencing analysis. *Microorganisms*, 7(11), 506.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110506>

OMS, UNICEF. 2020. Estado Mundial del Saneamiento: Un llamamiento urgente a transformar el saneamiento para mejorar la salud, los entornos, las economías y las sociedades. Nueva York: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia y Organización Mundial de la Salud, UNICEF ISBN 978-92-806-5245-1

Pasteur. L. 1878. The Germ Theory and its applications to medicine and surgery. Publicado en *Procedimientos de la Academia de Ciencias Francesa*, lxxxvi., pp. 1037-43.

Plaza, G., Jałowiecki, Ł., Głowacka, D., Hubeny, J., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2021). Insights into the microbial diversity and structure in a full-scale municipal wastewater treatment plant with particular regard to Archaea. *PloS One*, 16(4), e0250514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250514>

Plitnick, J., Griesemer, S., Lasek-Nesselquist, E., Singh, N., Lamson, D. M., & St George, K. (2021). Whole-genome sequencing of SARS-CoV-2: Assessment of the ion torrent Ampliseq panel and comparison with the Illumina MiSeq ARTIC protocol. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(12), e0064921. <https://doi.org/10.1128/JCM.00649-21>

Qin, H. Ji, B. Zhangb, S. Kongc, Z. 2018. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Marine Pollution Bulletin* 135, 801–807.

Qin, Y., Wang, X.-W., Lian, J., Zhao, Q.-F., & Jiang, H.-B. (2023). Combination of non-sterilized wastewater purification and high-level CO₂ bio-capture with substantial

biomass yield of an indigenous *Chlorella* strain. *The Science of the Total Environment*, 873(162442), 162442. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162442>

Reese, A. T., & Dunn, R. R. (2018). Drivers of microbiome biodiversity: A review of general rules, feces, and ignorance. *MBio*, 9(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01294-18>

Ríos-Castro, R., Cabo, A., Teira, E., Cameselle, C., Gouveia, S., Payo, P., Novoa, B., & Figueras, A. (2023). High-throughput sequencing as a tool for monitoring prokaryote communities in a wastewater treatment plant. *The Science of the Total Environment*, 861(160531), 160531. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160531>

Ruiz-Haddad, L., Ali, M., Pronk, M., van Loosdrecht, M. C. M., & Saikaly, P. E. (2024). Demystifying polyphosphate-accumulating organisms relevant to wastewater treatment: A review of their phylogeny, metabolism, and detection. *Environmental Science and Ecotechnology*, 21(100387), 100387. <https://doi.org/10.1016/j.esec.2024.100387>

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, U.S.A.

Sanz, J. L., & Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 42(2), 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>

Satoshi, I., Sadowsky, M.J., 2008 *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes' environments* 23(2): 101-108

Scheffer, M., S. Rinaldi, J. Huisman & F. J. Weissing, 2003. Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiologia* 491:9-18.

Shanks, O. C., Newton, R. J., Kelty, C. A., Huse, S. M., Sogin, M. L., & McLellan, S. L. (2013). Comparison of the microbial community structures of untreated wastewaters from different geographic locales. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2906-2913. <https://doi.org/10.1128/AEM.03448-12>

Sharma, S; Sanghi, R. 2012. *Advances in Water Treatment and Pollution Prevention*. Springer, Pg 46-48

Shchegolkova, N. M., Krasnov, G. S., Belova, A. A., Dmitriev, A. A., Kharitonov, S. L., Klimina, K. M., Melnikova, N. V., & Kudryavtseva, A. V. (2016). Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 90. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090>

Silva, A. N. B. da, Souza, R. de C. M. de, Honorato, N. R. M., Martins, R. R., Câmara, A. C. J. da, Galvão, L. M. da C., & Chiari, E. (2020). Comparison of phenol-chloroform and a commercial deoxyribonucleic acid extraction kit for identification of bloodmeal sources

from triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200189. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0189-2020>

Sotelo J; Piccini, C. 2014. Generación de un método basado en secuenciación masiva para detectar microorganismos nocivos en muestras de agua. Proyecto de investigación Aplicada Fondo Maria Viñas. FMV_1_2014_1_104673.

Søborg, D. A. et al. 2016. Bacterial human virulence genes across diverse habitats as assessed by in silico analysis of environmental metagenomes. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV). <https://doi: 10.3389/fmicb.2016.01712>.

Stokholm-Bjerregaard, M., McIlroy, S. J., Nierychlo, M., Karst, S. M., Albertsen, M., & Nielsen, P. H. (2017). A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>

Tessler, M., Neumann, J. S., Afshinnikoo, E., Pineda, M., Hersch, R., Velho, L. F. M., Segovia, B. T., Lansac-Toha, F. A., Lemke, M., DeSalle, R., Mason, C. E., & Brugler, M. R. (2017). Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 7(1), 6589. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06665-3>

Rzeznitzek, Gerhard Breve2, Ivan Rychlik. En Alexandra von Altrock, Alexandra Rath and Silke Rautenschlein. 2022. The effect of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonization on the gut morphology, functional integrity, and microbiota composition of female turkeys Janina

Thomas, V. Clark, J. Doré, J. 2015. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology* vol.10 Nº 9. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.87>

Totty, H., Miller, E., Moreno, E., Dunne, W. M., Jr, & Deol, P. (2016). Comparison of mechanical disruption techniques for rapid inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* species before identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(10), 2626–2627. <https://doi.org/10.1128/JCM.01096-16>

Waheed, H., Hashmi, I., Naveed, A. K., & Khan, S. J. (2013). Molecular detection of microbial community in a nitrifying–denitrifying activated sludge system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 527-532. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.009>

Umar, M., Roddick, F., & Fan, L. (2016). Comparison of coagulation efficiency of aluminium and ferric-based coagulants as pre-treatment for UVC/H₂O₂ treatment of wastewater RO concentrate. *Chemical Engineering Journal (Lausanne, Switzerland: 1996)*, 284, 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.109>

- Uruguay. (1967). Constitución de la República. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/constitucion/1967-1967>
- van der Stel, A.-X., & Wösten, M. M. S. M. (2019). Regulation of respiratory pathways in Campylobacterota: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01719>
- Venter, J.C. Remington, K. Heidelberg, J.F. Halpern, A.L. Rusch, D. Eisen, J.A. Wu, D.Y. Paulsen, I. Nelson, K.E. Nelson, W. Fouts, D.E. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 304(5667):66–74.
- Videnska, P. Smerkova, K. Zwinsova, B. Popovici, V. Micenkova, L. Sedlar, K. Budinska, E. 2019. Stool sampling and DNA isolation kits affect DNA quality and bacterial composition following 16S rRNA gene sequencing using MiSeq Illumina platform. *Sci Rep* 9, 13837 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49520-3>.
- Vierheilig, J. Savio, D. Ley, R. E. Mach, R. L. Farnleitner, A.H. Reischer, G. H. 2016. Potential applications of next generation DNA sequencing of 16S rRNA gene amplicons in microbial water quality monitoring. *Water Sci Technol*. 73(7): 1768.
- Vollenweider, R. A., 1976. Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia* 33:53-83.
- Wang, J., Chen, Y., Cai, P., Gao, Q., Zhong, H., Sun, W., & Chen, Q. 2022. Impacts of municipal wastewater treatment plant discharge on microbial community structure and function of the receiving river in Northwest Tibetan Plateau. *Journal of Hazardous Materials*, 423(Pt B), 127170. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127170>
- Wilén, B. M., Jin, B., & Lant, P. (2003). Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 47(12), 95–103. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0633>
- World Health Organization (WHO), 2003. Assessing microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods. Chapter 5. ISBN: 9241546301.
- WHO, UNICEF, 2021. Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2020: five years into the SDGs. Geneva: World Health Organization and the United Nations Children's Fund, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, ISBN (WHO) 978-92-4-003084-8
- Wu, J., Chen, Y., Zhao, J., Prosun, T. A., O'Brien, J. W., Coin, L., Hai, F. I., Sanderson-Smith, M., Bi, P., & Jiang, G. (2024). Associations between wastewater gut microbiome and community obesity rates: Potential microbial biomarkers for surveillance. *Soil & Environmental Health*, 2(2), 100081. <https://doi.org/10.1016/j.seh.2024.100081>

Wu, J., Jiang, B., Kong, Z., Yang, C., Li, L., Feng, B., Luo, Z., Xu, K.-Q., Kobayashi, T., & Li, Y.-Y. (2021). Improved stability of up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating starch wastewater by pre-acidification: Impact on microbial community and metabolic dynamics. *Bioresource Technology*, 326(124781), 124781.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124781>

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de la UNESCO). 2019.

Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2019: No dejar a nadie atrás. París, UNESCO.

Xia, Y., Wen, X., Zhang, B., & Yang, Y. 2018. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.005>

Yang, Z., Liu, P., Wei, H., Li, H., Li, J., Qiu, X., Ding, R., & Guo, X. 2022. Alteration in microbial community and antibiotic resistance genes mediated by microplastics during wastewater ultraviolet disinfection. *The Science of the Total Environment*, 825(153918), 153918. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153918>

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>

Ye, L., & Zhang, T. 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2681–2690. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4082-4>

Yu, L., Li, R., Delatolla, R., Zhang, R., Yang, X., & Peng, D. 2018. Natural continuous influent nitrifier immigration effects on nitrification and the microbial community of activated sludge systems. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 74, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.02.021>

Zhang, Z., Wang, Y., Leslie, G. L., & Waite, T. D. 2015. Effect of ferric and ferrous iron addition on phosphorus removal and fouling in submerged membrane bioreactors. *Water Research*, 69, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.011>

Zhang, S. Shi, J. Sharma, E. Li, X. Gao, S. Zhou, X. O'Brien, J. Coin, L. Liu, Y. Sivakumar, M. Hai, F. Jiang, G. 2023. In-sewer decay and partitioning of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and implications for their wastewater surveillance. *Water Research* 233 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119737>

9 Anexos: Material adicional

Tabla S 1. Tabla de análisis de diversidad de todos los puntos de muestreo. En esta tabla podemos observar por separado los valores de los diferentes índices de diversidad.

	Afluente JPV	Reactor JPV	Efluente AUV JPV	Efluente DUV JPV	Aguas Arriba JPV	Aguas Abajo JPV	Afluente Minas	Reactor Minas 1	Reactor Minas 2	Efluente AUV Minas	Efluente DUV Minas	Aguas Arriba Minas	Aguas Abajo Minas	Afluente TYT	Reactor TYT	Efluente AUV TYT	Efluente DUV TYT	Aguas Arriba TYT	Aguas Abajo TYT
Taxa_S	257	669	400	350	347	646	231	445	450	508	468	299	393	292	487	566	468	128	547
Individuals	36972	170648	62922	56095	52440	112348	50561	69862	67637	63281	65239	42354	51533	46334	64915	95905	61440	14862	95681
Dominance	0,009785	0,00857	0,00999	0,01168	0,0064	0,0065	0,03211	0,00665	0,006336	0,0039	0,00572	0,0069	0,005	0,03266	0,003682	0,00714	0,004156	0,0121	0,0038
Simpson	0,9902	0,9914	0,99	0,9883	0,9936	0,9935	0,9679	0,9934	0,9937	0,9961	0,9943	0,9931	0,995	0,9673	0,9963	0,9929	0,9958	0,9879	0,9962
Shannon_H	5,132	5,686	5,373	5,187	5,5	5,862	4,525	5,603	5,609	5,889	5,71	5,349	5,604	4,651	5,892	5,796	5,821	4,596	5,952
Evenness_e^H /S	0,6592	0,4403	0,539	0,5113	0,7055	0,5439	0,3995	0,6094	0,6067	0,7106	0,6452	0,7039	0,691	0,3585	0,7438	0,5812	0,7204	0,7744	0,7027
Menhinick	1,337	1,619	1,595	1,478	1,515	1,927	1,027	1,684	1,73	2,019	1,832	1,453	1,731	1,357	1,911	1,828	1,888	1,05	1,768
Margalef	24,34	55,45	36,11	31,92	31,84	55,46	21,24	39,81	40,37	45,86	42,13	27,97	36,13	27,09	43,86	49,25	42,36	13,22	47,61
Equitability	0,9249	0,8739	0,8968	0,8855	0,9404	0,9059	0,8314	0,9188	0,9182	0,9452	0,9287	0,9384	0,938	0,8193	0,9522	0,9144	0,9467	0,9473	0,944

Tabla S 2. Datos Físicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de José Pedro Varela. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista físicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce.

Fósforo Total José Pedro Varela			Escherichia Coli José Pedro Varela		
Fecha	Aguas Arriba (mg/L)	Aguas Abajo (mg/L)	Fecha	Aguas Arriba (NMP/ml)	Aguas Abajo (NMP/ml)
12/03/2014	0,55	1,45	12/03/2014	7000	8450
11/06/2014	0,58	1,15	11/06/2014	200	300
17/09/2014	0,38	0,59	17/09/2014	1400	1600
18/12/2014	0,23	2,64	18/12/2014	300	600
11/03/2015	1,57	6,17	11/03/2015	300	200
16/06/2015	0,08	5,06	16/06/2015	700	700
27/08/2015	0,32	0,49	27/08/2015	11800	60000
05/11/2015	0,20	1,83	05/11/2015	800	600
31/03/2016	0,58	1,94	31/03/2016	1300	2700
23/06/2016	0,07	1,03	23/06/2016	100	400
20/10/2016	0,36	0,05	20/10/2016	1700	3900
29/12/2016	0,37	1,21	29/12/2016	1050	5150
30/03/2017	0,17	4,99	30/03/2017	700	400
30/06/2017	0,19	1,23	30/06/2017	2000	930
28/09/2017	0,21	0,75	28/09/2017	750	1100
23/11/2017	0,25	2,45	23/11/2017	730	3400
22/06/2018	0,53	1,27	14/02/2018	650	1200
27/09/2018	0,37	1,11	22/06/2018	1400	600
30/11/2018	0,70	2,01	27/09/2018	500	350
03/04/2019	1,67	5,74	30/11/2018	75	17000
17/07/2019	0,20	2,09	03/04/2019	1700	1300
12/09/2019	0,20	0,51	17/07/2019	160	240
07/11/2019	0,26	1,08	12/09/2019	430	1400
30/07/2020	0,47	2,67	07/11/2019	120	4100
17/12/2020	1,11	8,54	30/07/2020	130	1900
04/02/2021	0,7	0,8	17/12/2020	110	2900
07/05/2021	0,34	1,25	04/02/2021	2500	3500
05/08/2021	0,12	1,39	07/05/2021	270	11000
04/11/2021	0,63	0,78	05/08/2021	170	9200
03/02/2022	0,48	4,67	04/11/2021	24000	24000
			03/02/2022	540	5500

Tabla S 3. Datos Fisicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de Minas. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista fisicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce

Fósforo Total Minas			Escherichia coli Minas		
Fecha	Aguas Arriba (mg/L)	Aguas Abajo (mg/L)	Fecha	Aguas Arriba (NMP/ml)	Aguas Abajo (NMP/ml)
30/01/2014	0,09	0,16	30/01/2014	9000	6400
24/04/2014	0,14	0,07	24/04/2014	300	500
24/07/2014	0,10	0,12	24/07/2014	4800	3700
02/10/2014	0,05	0,19	02/10/2014	300	100
07/01/2015	0,08	0,25	07/01/2015	2200	2300
09/04/2015	0,06	1,16	09/04/2015	100	200
30/07/2015	0,34	0,67	30/07/2015	14700	6800
29/10/2015	0,04	0,26	29/10/2015	100	500
07/01/2016	0,12	0,28	07/01/2016	1300	1500
14/04/2016	0,05	0,07	14/04/2016	4700	3300
14/07/2016	0,04	0,10	14/07/2016	200	300
05/10/2016	0,03	0,99	05/10/2016	700	100
12/01/2017	0,21	0,04	12/01/2017	600	800
02/02/2017	0,06	0,08	02/02/2017	270	100
27/04/2017	0,08	0,36	27/04/2017	2407	1961
20/07/2017	0,04	0,1	20/07/2017	620	620
12/10/2017	0,05	0,14	12/10/2017	630	520
31/01/2018	0,10		31/01/2018		2000
09/05/2018	0,15	0,24	08/08/2018	600	450
08/08/2018	0,10	0,1	14/11/2018	2300	2900
14/11/2018	0,10	0,12	21/01/2019	650	380
21/01/2019	0,10	0,1	08/05/2019	840	900
08/05/2019	0,10	0,23	07/08/2019	960	630
07/08/2019	0,07	0,27	30/10/2019	4100	3900
30/10/2019	0,07	0,08	13/11/2019	2900	1700
13/11/2019	0,07	0,21	05/02/2020	240	2600
05/02/2020	<0,07	0,36	24/07/2020	9800	6500
24/07/2020	0,09	<0,07	17/12/2020	1100	2900
17/12/2020	0,08	0,95	30/12/2020	480	9200
30/12/2020	0,07	2,11	03/03/2021	1200	540
03/03/2021	<0,07	0,38	02/06/2021	4600	6100
02/06/2021	<0,07	0,2	19/08/2021	420	520
19/08/2021	<0,07	<0,07	11/11/2021	780	660
11/11/2021	<0,07	0,17	23/02/2022	180	610
23/02/2022	<0,07	0,42			

Tabla S 4. Datos Fisicoquímicos y microbiológicos de los cauces receptores de Treinta y Tres. Esta tabla permite evaluar el impacto desde un punto de vista fisicoquímico o microbiológico que tiene el efluente en el cauce

Fósforo Total Treinta y Tres			Escherichia Coli Treinta y Tres		
Fecha	Aguas Arriba (mg/L)	Aguas Abajo (mg/L)	Fecha	Aguas Arriba (NMP/ml)	Aguas Abajo (NMP/ml)
15/03/2019	<0,10	0,12	15/03/2019	860	650
12/06/2019	<0,07	0,09	12/06/2019	4900	3700
09/10/2019	0,08	0,09	09/10/2019	74	130
05/12/2019	0,09	0,11	05/12/2019	110	120
12/03/2020	0,2	0,5	12/03/2020	560	1100
30/07/2020	0,07	0,09	30/07/2020	60	300
17/12/2020	0,2	0,22	17/12/2020	41	420
25/02/2021	<0,07	<0,07	25/02/2021	1100	1300
08/07/2021	0,07	0,1	08/07/2021	290	580
03/03/2022	0,09	0,1	03/12/2021	1200	1100
			03/03/2022	760	11000

Tabla S 5. Datos de NH₄ del efluente de Treinta y Tres

Efluente Treinta y Tres	
Fecha	NH₄ mg/L
14/01/2019	<1,0
25/01/2019	<1,0
08/02/2019	<1,0
15/03/2019	<1,0
08/04/2019	16
25/04/2019	<1,0
17/05/2019	1
30/05/2019	<1,0
12/06/2019	<1,0
28/06/2019	2,2
26/09/2019	11
09/10/2019	2,3
24/10/2019	8,2
07/11/2019	1,7
28/11/2019	1,7
05/12/2019	<1,0
26/12/2019	14
15/01/2020	7
31/01/2020	<1,0
12/02/2020	9,1
27/02/2020	<1,0
12/03/2020	<1,0
23/04/2020	<1,0
22/05/2020	<1,0
26/06/2020	3,2
30/07/2020	53,4
27/08/2020	26

17/09/2020	10
23/10/2020	<1,0
26/11/2020	31
17/12/2020	26
27/01/2021	<1,0
25/02/2021	<1,0
07/04/2021	12
30/04/2021	<1,0
27/05/2021	15
08/07/2021	12
22/07/2021	<1,0
12/08/2021	1
29/09/2021	<1,0
07/10/2021	<1,0
22/10/2021	<1,0
11/11/2021	11

Tabla S 6: Datos de NO₃ del efluente de José Pedro Varela

Efluente José Pedro Varela	
Fecha	NO₃ mg/L-N
12/03/2014	20,41
11/06/2014	35,30
17/09/2014	0,73
18/12/2014	54,20
16/06/2015	59,90
27/08/2015	7,30
05/11/2015	58,80
31/03/2016	28,30
23/06/2016	39,40
20/10/2016	8,40
29/12/2016	19,90
30/03/2017	44,40
30/06/2017	48,00
28/09/2017	35,00
23/11/2017	58,00
14/02/2018	58
22/06/2018	36
27/09/2018	35
30/11/2018	11
21/01/2019	23
15/03/2019	54
03/04/2019	65
25/04/2019	71
17/05/2019	61
12/06/2019	27
17/07/2019	55
09/10/2019	12
07/11/2019	30
18/12/2019	38
30/01/2020	15
27/02/2020	55
23/04/2020	43

Tabla S 7. Tabla de reads de los géneros de patógenos encontrados en la secuenciación del gen 16S. Aquí podemos observar la existencia de bacterias que tienen el potencial de tener los genes patogénicos buscados en la secuenciación masiva con el panel de Ampliseq.

	<i>Escherichia- Shigella</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
Afluente JPV	0	0	0	272	0
Reactor JPV	0	33	0	238	0
Efluente AUV JPV	0	334	0	665	0
Efluente DUV JPV	0	1500	92	679	0
Aguas Arriba JPV	0	199	0	105	65
Aguas Abajo JPV	0	543	0	876	49
Afluente Minas	0	0	0	187	0
Reactor 1 Minas	0	95	0	99	0
Reactor 2 Minas	0	71	0	78	0
Efluente AUV Minas	0	108	86	233	0
Efluente DUV Minas	0	122	0	284	0
Aguas Arriba Minas	0	0	0	38	0
Aguas Abajo Minas	0	68	0	0	0
Afluente TYT	18	21	0	187	0
Reactor TYT	0	157	0	156	0
Efluente AUV TYT	0	263	133	188	0
Efluente DUV TYT	0	238	82	256	0
Aguas Arriba TYT	7	4	3	16	0
Aguas Abajo TYT	0	87	0	110	86

Tabla S 8. Tabla de los ASVs con mayor abundancia relativa y con su taxonomía asignada por MIDAS de cada reactor de las tres plantas de tratamiento estudiadas.

Muestra	ASV	Abundancia relativa	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Reactor JPV	ASV4	0,0511	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor 1 Minas	ASV12	0,0286	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 1 Minas	ASV22	0,0283	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 1 Minas	ASV7	0,0272	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor 2 Minas	ASV7	0,0256	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor JPV	ASV15	0,0248	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	OLB12	midas_s_21673
Reactor 2 Minas	ASV12	0,0244	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor JPV	ASV10	0,0240	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor JPV	ASV16	0,0238	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor 2 Minas	ASV22	0,0228	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 2 Minas	ASV18	0,0208	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor JPV	ASV27	0,0194	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_2883	midas_s_13452
Reactor JPV	ASV23	0,0165	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_56	midas_s_2526
Reactor JPV	ASV51	0,0151	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	OLB12	midas_s_21673
Reactor 1 Minas	ASV48	0,0147	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor JPV	ASV55	0,0147	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor 1 Minas	ASV60	0,0143	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 1 Minas	ASV94	0,0142	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor JPV	ASV21	0,0140	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas_ureae</i>
Reactor 1 Minas	ASV32	0,0136	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV61	0,0133	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_11773
Reactor 1 Minas	ASV67	0,0130	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV19	0,0130	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor 1 Minas	ASV45	0,0129	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor 1 Minas	ASV100	0,0128	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123

Reactor 2 Minas	ASV45	0,0128	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor 2 Minas	ASV32	0,0125	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor 2 Minas	ASV44	0,0125	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor JPV	ASV42	0,0125	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 2 Minas	ASV60	0,0123	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 2 Minas	ASV48	0,0122	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor 2 Minas	ASV67	0,0122	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 1 Minas	ASV19	0,0121	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor TYT	ASV85	0,0120	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	NA
Reactor 2 Minas	ASV19	0,0120	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV94	0,0118	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 2 Minas	ASV100	0,0117	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor JPV	ASV71	0,0114	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor TYT	ASV106	0,0111	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_82460	midas_s_82460
Reactor 2 Minas	ASV151	0,0111	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor JPV	ASV92	0,0109	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_2883	midas_s_13452
Reactor 2 Minas	ASV76	0,0107	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor 2 Minas	ASV177	0,0103	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parasediminibacterium</i>	midas_s_22506
Reactor JPV	ASV68	0,0099	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	<i>Hassallia</i>	midas_s_10463
Reactor TYT	ASV180	0,0095	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Sphaerotilus</i>	midas_s_14876
Reactor TYT	ASV73	0,0095	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Sutterellaceae</i>	AAP99	midas_s_9909
Reactor 1 Minas	ASV143	0,0090	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor JPV	ASV115	0,0089	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	OLB12	midas_s_21673
Reactor TYT	ASV10	0,0089	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor JPV	ASV109	0,0088	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor JPV	ASV99	0,0085	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_56	midas_s_2526
Reactor JPV	ASV136	0,0082	<i>Planctomycetota</i>	<i>Phycisphaerae</i>	<i>Phycisphaerales</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	midas_g_19286	midas_s_19286
Reactor TYT	ASV139	0,0077	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_11773

Reactor 1 Minas	ASV102	0,0077	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor JPV	ASV84	0,0077	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor JPV	ASV176	0,0076	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_2883	midas_s_13452
Reactor JPV	ASV161	0,0075	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	OLB12	midas_s_21673
Reactor 1 Minas	ASV183	0,0075	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor TYT	ASV506	0,0075	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	<i>Oikopleura</i>	midas_s_8270
Reactor JPV	ASV127	0,0074	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_56	midas_s_2526
Reactor 1 Minas	ASV44	0,0074	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor TYT	ASV91	0,0073	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor JPV	ASV156	0,0072	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor JPV	ASV74	0,0071	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_723
Reactor 1 Minas	ASV18	0,0070	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor 2 Minas	ASV183	0,0069	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor TYT	ASV252	0,0068	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_82460	midas_s_82460
Reactor 1 Minas	ASV189	0,0068	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV171	0,0067	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_11773
Reactor 2 Minas	ASV299	0,0067	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor TYT	ASV31	0,0067	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Chitinimonadaceae</i>	<i>Chitinivorax</i>	midas_s_1442
Reactor 2 Minas	ASV102	0,0067	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV294	0,0065	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	NA
Reactor 1 Minas	ASV277	0,0065	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 2 Minas	ASV214	0,0065	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor TYT	ASV175	0,0064	<i>Bdellovibrionota</i>	<i>Bdellovibrionia</i>	<i>Bdellovibrionales</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	midas_g_45211	midas_s_49409
Reactor JPV	ASV89	0,0064	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas_ ureae</i>
Reactor JPV	ASV112	0,0064	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	<i>Hassallia</i>	midas_s_11088
Reactor 2 Minas	ASV143	0,0064	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor 2 Minas	ASV189	0,0064	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV262	0,0063	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	midas_s_9370

Reactor 1 Minas	ASV145	0,0063	<i>Spirochaetota</i>	<i>Leptospirae</i>	<i>Leptospirales</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Turneriella</i>	<i>Turneriella_parva</i>
Reactor 2 Minas	ASV173	0,0062	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor TYT	ASV72	0,0062	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_953
Reactor JPV	ASV103	0,0061	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas_ureae</i>
Reactor TYT	ASV135	0,0061	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_8641
Reactor JPV	ASV18	0,0061	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor JPV	ASV210	0,0060	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_2883	midas_s_13452
Reactor JPV	ASV152	0,0059	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 1 Minas	ASV93	0,0058	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	NA	NA	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV277	0,0058	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor TYT	ASV133	0,0056	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Ca_Villigracilis</i>	midas_s_6664
Reactor 1 Minas	ASV336	0,0056	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor TYT	ASV223	0,0056	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Sutterellaceae</i>	AAP99	midas_s_9909
Reactor 1 Minas	ASV91	0,0055	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor JPV	ASV212	0,0055	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor JPV	ASV235	0,0055	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor TYT	ASV293	0,0055	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_82460	midas_s_82460
Reactor TYT	ASV131	0,0054	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	midas_s_1356
Reactor TYT	ASV197	0,0053	<i>Gemmatimonadota</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	midas_g_764	midas_s_929
Reactor TYT	ASV117	0,0052	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor TYT	ASV42	0,0051	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 2 Minas	ASV631	0,0051	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parasediminibacterium</i>	midas_s_22506
Reactor JPV	ASV311	0,0051	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	<i>Hassallia</i>	midas_s_10463
Reactor JPV	ASV124	0,0050	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_6692	midas_s_6692
Reactor 1 Minas	ASV385	0,0050	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV131	0,0050	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	midas_s_1356
Reactor 2 Minas	ASV489	0,0050	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV91	0,0050	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116

Reactor TYT	ASV194	0,0049	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	midas_s_10003
Reactor 1 Minas	ASV131	0,0049	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	midas_s_1356
Reactor 1 Minas	ASV409	0,0049	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 1 Minas	ASV117	0,0048	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor TYT	ASV254	0,0048	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_10851
Reactor JPV	ASV129	0,0047	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	NS9_marine_group	midas_g_225	NA
Reactor 1 Minas	ASV62	0,0047	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Aquabacterium_commune</i>
Reactor 1 Minas	ASV251	0,0047	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Inhella</i>	midas_s_10375
Reactor 1 Minas	ASV72	0,0047	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_953
Reactor 1 Minas	ASV221	0,0046	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV50	0,0046	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Propionivibrio</i>	NA
Reactor 1 Minas	ASV206	0,0046	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_729	midas_s_4084
Reactor TYT	ASV34	0,0046	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Ideonella</i>	midas_s_1611
Reactor TYT	ASV268	0,0046	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	midas_g_679	midas_s_30423
Reactor 2 Minas	ASV279	0,0046	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 1 Minas	ASV31	0,0045	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Chitinimonadaceae</i>	<i>Chitinivorax</i>	midas_s_1442
Reactor JPV	ASV310	0,0045	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387
Reactor 2 Minas	ASV221	0,0045	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV317	0,0045	<i>Patescibacteria</i>	<i>Parcubacteria</i>	<i>Ca_Nomurabacteria</i>	midas_f_32931	midas_g_73107	midas_s_73107
Reactor TYT	ASV79	0,0045	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV309	0,0045	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Nitrotoga</i>	midas_s_204
Reactor 1 Minas	ASV279	0,0045	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV357	0,0045	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>	midas_s_1449
Reactor JPV	ASV256	0,0045	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_56	midas_s_2526
Reactor 1 Minas	ASV274	0,0044	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV287	0,0044	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor JPV	ASV292	0,0044	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	OLB12	midas_s_21673
Reactor 1 Minas	ASV187	0,0044	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	NA	NA

Reactor TYT	ASV367	0,0044	<i>Patescibacteria</i>	<i>Parcubacteria</i>	<i>Ca_Moranbacteria</i>	midas_f_9621	midas_g_11532	midas_s_39222
Reactor TYT	ASV276	0,0043	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_5352
Reactor TYT	ASV84	0,0043	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 1 Minas	ASV241	0,0043	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rubrivivax</i>	midas_s_1148
Reactor 1 Minas	ASV341	0,0043	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor 2 Minas	ASV373	0,0043	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	midas_g_6210	midas_s_42789
Reactor JPV	ASV150	0,0043	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_3487	midas_s_16883
Reactor 1 Minas	ASV498	0,0043	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor 2 Minas	ASV638	0,0043	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax_delafieldii</i>
Reactor 1 Minas	ASV215	0,0043	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Opitutales</i>	<i>Opitutaceae</i>	<i>Lacunisphaera</i>	NA
Reactor TYT	ASV379	0,0042	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	midas_s_10362
Reactor TYT	ASV540	0,0042	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Sphaerotilus</i>	midas_s_14876
Reactor 2 Minas	ASV117	0,0042	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV386	0,0042	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	<i>SH3-11</i>	midas_s_35769
Reactor 1 Minas	ASV323	0,0042	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium_lutivivi</i>
Reactor 1 Minas	ASV116	0,0042	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	<i>DEV114</i>	midas_s_82770
Reactor JPV	ASV200	0,0042	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Micavibrionales</i>	midas_f_2943	midas_g_7280	midas_s_28022
Reactor TYT	ASV383	0,0042	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_17	midas_s_17
Reactor JPV	ASV246	0,0042	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 2 Minas	ASV341	0,0042	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor 1 Minas	ASV285	0,0041	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reactor TYT	ASV1034	0,0041	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Sphaerotilus</i>	midas_s_14876
Reactor 1 Minas	ASV244	0,0041	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV1045	0,0041	<i>Patescibacteria</i>	<i>Parcubacteria</i>	<i>Ca_Nomurabacteria</i>	midas_f_26526	midas_g_26526	midas_s_58415
Reactor TYT	ASV178	0,0041	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	<i>Thauera_terpenica</i>
Reactor TYT	ASV301	0,0041	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Sutterellaceae</i>	AAP99	midas_s_9909
Reactor 2 Minas	ASV73	0,0041	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Sutterellaceae</i>	AAP99	midas_s_9909
Reactor JPV	ASV358	0,0041	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Ferruginibacter</i>	midas_s_387

Reactor 1 Minas	ASV461	0,0041	<i>Spirochaetota</i>	<i>Leptospirae</i>	<i>Leptospirales</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Turneriella</i>	<i>Turneriella_parva</i>
Reactor 2 Minas	ASV1	0,0040	<i>Campylobacterota</i>	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacterales</i>	<i>Arcobacteraceae</i>	<i>Arcobacter</i>	midas_s_2255
Reactor 2 Minas	ASV187	0,0040	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV133	0,0040	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Ca_Villigracilis</i>	midas_s_6664
Reactor JPV	ASV371	0,0040	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	<i>Hassallia</i>	midas_s_10463
Reactor 1 Minas	ASV233	0,0040	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reactor 1 Minas	ASV468	0,0040	<i>Spirochaetota</i>	<i>Leptospirae</i>	<i>Leptospirales</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Turneriella</i>	<i>Turneriella_parva</i>
Reactor JPV	ASV269	0,0040	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_723
Reactor 2 Minas	ASV842	0,0040	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parasediminibacterium</i>	midas_s_22506
Reactor TYT	ASV331	0,0039	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Lacihabitans</i>	midas_s_85
Reactor TYT	ASV154	0,0039	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Thermomonas</i>	<i>Thermomonas_carbonis</i>
Reactor 2 Minas	ASV145	0,0039	<i>Spirochaetota</i>	<i>Leptospirae</i>	<i>Leptospirales</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Turneriella</i>	<i>Turneriella_parva</i>
Reactor 2 Minas	ASV244	0,0039	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor 2 Minas	ASV376	0,0039	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 2 Minas	ASV206	0,0039	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_729	midas_s_4084
Reactor TYT	ASV237	0,0039	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	midas_g_1003	midas_s_13340
Reactor 2 Minas	ASV336	0,0039	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor TYT	ASV186	0,0039	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV683	0,0039	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	NA	NA
Reactor 1 Minas	ASV376	0,0039	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV44	0,0038	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor TYT	ASV345	0,0038	<i>Patescibacteria</i>	<i>Saccharimonadia</i>	<i>Saccharimonadales</i>	midas_f_67	midas_g_8983	midas_s_12369
Reactor 1 Minas	ASV154	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Thermomonas</i>	<i>Thermomonas_carbonis</i>
Reactor 1 Minas	ASV214	0,0038	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor 2 Minas	ASV274	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>	NA
Reactor TYT	ASV349	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Ca_Accumulibacter</i>	NA
Reactor 1 Minas	ASV76	0,0038	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor 1 Minas	ASV487	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123

Reactor JPV	ASV354	0,0038	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	AKYH767	midas_g_6425	midas_s_11619
Reactor 2 Minas	ASV148	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azospira</i>	midas_s_1294
Reactor 2 Minas	ASV405	0,0038	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 2 Minas	ASV31	0,0038	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Chitinimonadaceae</i>	<i>Chitinivorax</i>	midas_s_1442
Reactor 2 Minas	ASV251	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Inhella</i>	midas_s_10375
Reactor TYT	ASV679	0,0037	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Thermoleophilia</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	67-14	midas_g_52	midas_s_1529
Reactor TYT	ASV243	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_953
Reactor TYT	ASV639	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	NA	NA
Reactor 1 Minas	ASV307	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor TYT	ASV673	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	NA	NA
Reactor TYT	ASV417	0,0037	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	midas_g_2835	midas_s_2835
Reactor 1 Minas	ASV25	0,0037	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcales-Tissierellales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Romboutsia</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV95	0,0037	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>	midas_s_4
Reactor 1 Minas	ASV405	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor JPV	ASV275	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_406
Reactor 2 Minas	ASV456	0,0036	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor TYT	ASV202	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor TYT	ASV641	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	37-13	midas_g_543	midas_s_543
Reactor TYT	ASV350	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Sphaerotilus</i>	NA
Reactor TYT	ASV204	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i>	midas_s_10145
Reactor 1 Minas	ASV386	0,0036	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor JPV	ASV166	0,0036	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_6582
Reactor JPV	ASV195	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	midas_s_676
Reactor JPV	ASV224	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_723
Reactor 2 Minas	ASV182	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	env.OPS_17	midas_g_3838	midas_s_17340
Reactor TYT	ASV388	0,0036	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_7597	midas_s_47517
Reactor 2 Minas	ASV409	0,0036	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 2 Minas	ASV440	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336

Reactor 1 Minas	ASV440	0,0036	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor TYT	ASV205	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor 1 Minas	ASV101	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	midas_s_3983
Reactor 1 Minas	ASV299	0,0035	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	SH3-11	midas_s_35769
Reactor 2 Minas	ASV116	0,0035	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Pedosphaerales</i>	<i>Pedosphaeraceae</i>	DEV114	midas_s_82770
Reactor JPV	ASV230	0,0035	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reactor 1 Minas	ASV178	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	<i>Thauera_terpenica</i>
Reactor 2 Minas	ASV487	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor 2 Minas	ASV587	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_33	midas_s_50
Reactor 1 Minas	ASV82	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_2189	midas_s_11198
Reactor TYT	ASV82	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_2189	midas_s_11198
Reactor TYT	ASV148	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azospira</i>	midas_s_1294
Reactor TYT	ASV395	0,0035	<i>Patescibacteria</i>	<i>Saccharimonadia</i>	<i>Saccharimonadales</i>	midas_f_67	midas_g_2020	midas_s_10353
Reactor TYT	ASV623	0,0035	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	NA
Reactor 2 Minas	ASV79	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV101	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	midas_s_3983
Reactor JPV	ASV330	0,0035	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_11003	midas_g_11003	midas_s_11003
Reactor 2 Minas	ASV241	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rubrivivax</i>	midas_s_1148
Reactor 1 Minas	ASV373	0,0035	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	midas_g_6210	midas_s_42789
Reactor TYT	ASV20	0,0035	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_887	midas_s_3291
Reactor 1 Minas	ASV366	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caedibacterales</i>	<i>Caedibacteraceae</i>	<i>Caedibacter</i>	midas_s_49040
Reactor 2 Minas	ASV72	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_953
Reactor 1 Minas	ASV26	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogloea</i>	<i>Zoogloea_ramigera</i>
Reactor TYT	ASV26	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogloea</i>	<i>Zoogloea_ramigera</i>
Reactor 2 Minas	ASV951	0,0034	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parasediminibacterium</i>	midas_s_22506
Reactor 1 Minas	ASV315	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>	midas_s_4561
Reactor 1 Minas	ASV473	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	midas_o_24	midas_f_107	midas_g_32584	midas_s_32584
Reactor 1 Minas	ASV587	0,0034	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_33	midas_s_50

Reactor 2 Minas	ASV307	0,0033	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_139
Reactor JPV	ASV213	0,0033	<i>Gemmatimonadota</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	midas_g_1970	midas_s_57989
Reactor 1 Minas	ASV37	0,0033	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Agitococcus_lubricus_group</i>	NA
Reactor 1 Minas	ASV489	0,0033	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	NA	NA
Reactor TYT	ASV391	0,0033	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	midas_s_11773
Reactor 1 Minas	ASV464	0,0033	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	midas_s_64306
Reactor TYT	ASV195	0,0033	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_558	midas_s_676
Reactor TYT	ASV364	0,0033	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	midas_f_108	midas_g_10025	midas_s_11511
Reactor TYT	ASV398	0,0033	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Ca_Villigracilis</i>	NA
Reactor JPV	ASV260	0,0033	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Brevifollis</i>	midas_s_66352
Reactor 1 Minas	ASV377	0,0033	<i>Bdellovibrionota</i>	<i>Oligoflexia</i>	0319-6G20	midas_f_3092	midas_g_24700	midas_s_39397
Reactor 2 Minas	ASV1228	0,0032	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Nitrotoga</i>	midas_s_204
Reactor 2 Minas	ASV511	0,0032	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_1336	midas_s_1336
Reactor 1 Minas	ASV347	0,0032	<i>Proteobacteria</i>	NA	NA	NA	NA	NA
Reactor TYT	ASV332	0,0032	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i>	midas_s_13834
Reactor 1 Minas	ASV523	0,0032	<i>Myxococcota</i>	<i>Polyangia</i>	<i>Polyangiales</i>	<i>Phaselicytidaceae</i>	<i>Phaselicystis</i>	midas_s_52974
Reactor 2 Minas	ASV295	0,0032	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	NA
Reactor TYT	ASV563	0,0032	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_82460	midas_s_82460
Reactor 1 Minas	ASV20	0,0032	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_887	midas_s_3291
Reactor 1 Minas	ASV488	0,0032	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reactor JPV	ASV151	0,0032	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor 1 Minas	ASV177	0,0032	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parasediminibacterium</i>	midas_s_22506
Reactor JPV	ASV520	0,0032	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Microscillaceae</i>	<i>Hassallia</i>	midas_s_11088
Reactor 2 Minas	ASV93	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	NA	NA	NA	NA
Reactor 2 Minas	ASV240	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor 2 Minas	ASV369	0,0031	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	37-13	midas_g_543	midas_s_543
Reactor 2 Minas	ASV82	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	midas_g_2189	midas_s_11198
Reactor TYT	ASV1137	0,0031	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_6692	midas_s_56040

Reactor 2 Minas	ASV202	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor TYT	ASV1	0,0031	<i>Campylobacterota</i>	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacterales</i>	<i>Arcobacteraceae</i>	<i>Arcobacter</i>	midas_s_2255
Reactor 1 Minas	ASV240	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor TYT	ASV23	0,0031	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_56	midas_s_2526
Reactor JPV	ASV430	0,0031	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	midas_g_6692	midas_s_6692
Reactor 2 Minas	ASV26	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogloea</i>	<i>Zoogloea_ramigera</i>
Reactor 2 Minas	ASV141	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella</i>	midas_s_147
Reactor 1 Minas	ASV272	0,0031	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiales</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Neochlamydia</i>	midas_s_82383
Reactor 1 Minas	ASV646	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillales</i>	midas_f_406	<i>Stella</i>	midas_s_11123
Reactor JPV	ASV265	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas_ureae</i>
Reactor JPV	ASV360	0,0031	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	midas_g_729	midas_s_1129
Reactor 2 Minas	ASV154	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Thermomonas</i>	<i>Thermomonas_carbonis</i>
Reactor 2 Minas	ASV582	0,0031	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor TYT	ASV97	0,0031	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	midas_s_1978
Reactor TYT	ASV239	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>	midas_s_11904
Reactor 1 Minas	ASV205	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_116
Reactor TYT	ASV18	0,0030	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>	midas_s_90
Reactor TYT	ASV107	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella</i>	midas_s_1282
Reactor 1 Minas	ASV309	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Nitrotoga</i>	midas_s_204
Reactor TYT	ASV270	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Ahniella</i>	midas_s_953
Reactor TYT	ASV826	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	NA
Reactor TYT	ASV902	0,0030	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	midas_g_1003	midas_s_13340
Reactor 2 Minas	ASV315	0,0030	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>	midas_s_4561

