

Tesis Doctoral

# Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes

Ibarbalz, Federico Matías

2016-04-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ibarbalz, Federico Matías. (2016-04-18). Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ibarbalz, Federico Matías. "Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-18.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Federico Matías Ibarbalz**

Director de tesis: Dr. Leonardo Erijman  
Director Asistente: Dra. Eva L. M. Figuerola  
Consejero de Estudios: Dr. Jorge P. Muschietti

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
“Dr. Héctor N. Torres”

Buenos Aires, 2016

# Resumen

## **Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes.**

El tratamiento biológico de efluentes domésticos o industriales por lodos activados se basa en la actividad de poblaciones microbianas capaces de autoensamblarse para constituir una comunidad dinámica de alta diversidad. Revelar los factores que determinan la estructura de las comunidades microbianas y los mecanismos que conducen a su ensamblado es crítico para mejorar la gestión del proceso de tratamiento y para proveer un marco conceptual que pueda ser aplicado a comunidades microbianas en otros procesos de biotecnología ambiental. Varios estudios previos realizados en plantas de tratamiento de lodos activados municipales, de diferente configuración y provenientes de sitios geográficamente distantes, sugerían la presencia de taxones bacterianos de alto rango (filos) comunes a todos los sistemas estudiados. En base a estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que los determinantes ecológicos del proceso de tratamiento relacionados con la formación del agregado biológico (*floc*), que permite la retención de la biomasa en el sistema, serían los principales responsables de definir la composición de la comunidad bacteriana en lodos activados.

Los objetivos de esta tesis fueron: 1) comprobar si existe un grupo común (*core*) de taxones bacterianos y funciones en plantas de tratamiento de efluentes municipales e industriales, y 2) determinar cuáles son las variables ambientales y operacionales relevantes en la estructuración de las comunidades bacterianas de los lodos activados. Se realizaron estudios de metagenómica comparativa, utilizando técnicas de pirosecuenciación de amplicones de las regiones variables V1-V3 del gen de ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), y secuenciación al azar de ADN metagenómico. Se analizaron lodos activados de 9 plantas de tratamiento de efluentes ubicadas en Argentina, dos municipales y siete industriales, cada una muestreada en dos oportunidades, separadas por períodos de hasta 4 años, conjuntamente con los datos metagenómicos de 12 plantas de tratamiento industriales y municipales localizadas en China, India, Singapur y Corea del Sur, generados en otros laboratorios.

Se determinó que la diversidad taxonómica y funcional es significativamente mayor en lodos activados municipales que en industriales. Cada sistema de lodos activados que trata un efluente industrial particular presentó una composición bacteriana característica, reproducible en el tiempo, y marcadamente distinguible del patrón de filos y clases bacterianas observado en plantas municipales. A pesar de los cambios a nivel de género dentro de cada planta, se observó una conservación de los perfiles de contenido de GC en los metagenomas. Se detectó una preferencia particular de ciertos grupos bacterianos consistente con diferencias subyacentes en las abundancias de categorías funcionales particulares, que a su vez se relacionaron con la metabolización de constituyentes específicos de los efluentes. Se concluye que las características del efluente son el principal determinante de la estructuración de las comunidades bacterianas en sistemas de lodos activados. Asimismo, se sugiere que el aumento en la variedad de sustratos que ingresan a los procesos de tratamiento, por ejemplo combinando efluentes de diferentes orígenes en parques industriales, permitiría la conformación de comunidades microbianas más robustas en términos de resistencia y resiliencia frente a perturbaciones.

Los modelos mecanicísticos como el ASM1 o el ASM3, que son herramientas valiosas para la representación de procesos biológicos que ocurren en biorreactores, son calibrados utilizando parámetros derivados de plantas de tratamiento municipales. Los resultados obtenidos en esta Tesis resaltan la importancia de considerar las diferencias taxonómicas y funcionales entre lodos activados industriales y municipales, ya que las mismas podrían reflejar cambios en la cinética de consumo de sustratos y en la formación de productos de almacenamiento.

**Palabras clave:** Lodos activados, tratamiento de efluentes, ensamblado de comunidades microbianas, ARN ribosomal 16S, metagenómica

# Abstract

## **Metagenomics in activated sludge. Drivers of bacterial community assembly in wastewater treatment.**

Biological treatment of domestic and industrial wastewater by activated sludge relies on a self-assembled, highly diverse and dynamic microbial community. Revealing the factors that determine the community structure and the mechanisms that drive microbial community assembly in activated sludge is critical to improve the reliability of wastewater treatment management and to help developing a conceptual framework that could be applied to microbial communities in other processes of environmental biotechnology. Several previous studies, conducted on municipal wastewater treatment plants of varying configuration and geographical location, indicated the presence of a common core of high-rank bacterial taxa (phyla). Based on these results, it was hypothesized that the ecological drivers related to the floc formation, a biological aggregate that allows biomass retention, would be the main factors defining the bacterial community composition in activated sludge.

The objectives of this work were: 1) to test the existence of a common core of bacterial taxa and functions across municipal and industrial wastewater treatment plants, and 2) to determine which environmental and operational variables are relevant in structuring the bacterial communities of activated sludge. Comparative metagenomic studies were performed utilizing amplicon-sequencing of V1-V3 variable regions of the 16S rRNA gene, and shotgun-sequencing of metagenomic DNA. Two municipal and seven industrial wastewater treatment plants located in Argentina were surveyed, each sampled twice, at times separated by periods of up to 4 years, and analyzed in conjunction with the metagenomic data sets of 12 other municipal and industrial wastewater treatment plants located in China, India, Singapore and South Korea, generated in other laboratories.

The taxonomic and functional diversity in municipal activated sludge was found to be significantly higher than that of industrial activated sludge. Each industrial activated sludge exhibited a unique bacterial composition, occurring in a reproducible manner, clearly distinguishable from the high-rank bacterial taxa pattern present in municipal

plants. Interestingly, in spite of a changing genera profile within each community, there was a distinct GC content profile in their metagenomes. A particular preference of certain bacterial groups was detected, and it was consistent with underlying differences in the abundance of specific functional categories, which were at the same time related with metabolic pathways involving specific wastewater components. The conclusion is that wastewater features are the main drivers for bacterial community structure in activated sludge. Moreover, an increase in the variety of influent substrates, e.g. by the combination of different influents within an industrial park, would allow the existence of more robust microbial communities, in terms of resistance and resilience against disturbances.

Mechanistic models like ASM1 or ASM3, which are valuable tools for the representation of biological processes taking place in bioreactors, are calibrated using parameters from municipal treatment plants. The results obtained in this Thesis highlight the importance of considering the taxonomic and functional differences between municipal and industrial activated sludge, as these may reflect changes in the kinetics of substrate consumption and storage products formation.

**Key words:** Activated sludge, wastewater treatment, microbial community assembly, 16S ribosomal RNA, metagenomics

# Agradecimientos

A mi director, Leonardo Erijman, por haber liderado este trabajo con talento y excelencia, por sus valiosas enseñanzas que aportaron a mi formación, por compartir sus experiencias, por su constante dedicación, por las enormes oportunidades brindadas.

A mi directora asistente, Eva Figuerola, porque su empuje y su ayuda allanaron significativamente mi camino hacia el aprendizaje de la ecología microbiana, la bioinformática y la estadística.

A todo el grupo del laboratorio, porque sin el compañerismo, el apoyo y la amistad es difícil, si no imposible, realizar una tesis de doctorado. En particular, a Esteban Orellana, por su aporte fundamental en la última parte de esta tesis, por mostrar gran compromiso y responsabilidad frente al trabajo; a María Victoria Pérez, también por su gran aporte a esta tesis, por su enorme generosidad en conocimiento, en muestras y en tiempo, y por trabajar junto a mí codo a codo; y a Leandro Guerrero, Joaquín Ayarza y Silvina Rosa, por su tiempo, por sus muestras, y por su importante ayuda al comienzo de mi doctorado.

A la Prof. Dr. Kornelia Smalla, por recibirme con tanta energía, por ofrecer su conocimiento y su laboratorio con generosidad, por contagiar entusiasmo. Y a su fabuloso grupo de trabajo, vitales para mi estancia en Braunschweig, Alemania.

A Jorge Muschietti (consejero de estudios), Agustina Mazzella y Mariana Obertello junto a sus becarios y estudiantes, por el apoyo y la excelente predisposición, por generar un ambiente de trabajo ameno y colaborativo, por las charlas, las tortas, por esta etapa compartida que voy a recordar siempre.

A los todos los amigos, por compartir la vida.

A mi familia, cercana y extendida, por su apoyo incondicional, por su cariño, por su sostén. Mención especial a mi abuela, por la corrección del manuscrito.

A mi novia, por elegirme, por interesarse, por preocuparse, por aguantar, por animarse.

Al INGEBI, sus directivos y todos sus integrantes, por abrirme sus puertas, por la agradable atmósfera de trabajo, por el espíritu abierto y colaborativo, por el compañerismo.

Al CONICET, por haberme otorgado una valiosa beca por 5 años.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por su excelente tarea de formación y gestión.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

- Ibarbalz FM, Figuerola ELM, Erijman L (2013). Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water Res.* 47(11):3854-64. doi: 10.1016/j.watres.2013.04.010.
- Ibarbalz FM, Pérez MV, Figuerola ELM, Erijman L (2014). The bias associated with amplicon sequencing does not affect the quantitative assessment of bacterial community dynamics. *PLoS ONE* 9(6): e99722. doi: 10.1371/journal.pone.0099722
- Ibarbalz FM, Orellana E, Figuerola ELM, Erijman L (enviado a *Applied and Environmental Microbiology*). Shotgun metagenomic profiles have a high capacity to discriminate activated sludge according to wastewater type.



# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>6</b>
<b>Índice.....</b>	<b>8</b>
<b>Glosario.....</b>	<b>10</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
Uso del agua y tratamiento de efluentes.....	11
El proceso de lodos activados y la ecología.....	14
Ensamblado de comunidades microbianas.....	18
Comunidades microbianas en lodos activados.....	22
Potencial fenotípico de las comunidades microbianas.....	27
<b>Construcción de la hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivos generales.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>31</b>
1. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES Y MUESTREO.....	31
Características de las plantas de tratamiento y sus efluentes.....	31
Muestreo y almacenamiento.....	34
Diseño experimental.....	34
Determinaciones químicas en efluentes crudos.....	36
2. PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S.....	37
Extracción de ADN.....	37
PCR-DGGE.....	37
PCR y secuenciación de amplicones.....	39
Análisis de datos de pirosecuenciación de amplicones.....	39
3. SECUENCIACIÓN AL AZAR DE ADN METAGENÓMICO.....	45
Extracción de ADN y secuenciación.....	45
Análisis de datos de secuenciación masiva al azar.....	45
Ensamblado de lecturas metagenómicas.....	47
4. ANÁLISIS DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES.....	49
Ensayos de PCR cuantitativa.....	49
Cassettes génicos en integrones.....	51
<b>Resultados.....</b>	<b>53</b>

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES.....	53
2. PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S.....	55
Evaluación preliminar de la diversidad por PCR-DGGE.....	55
Secuenciación de amplicones: Estructura de la comunidad bacteriana a niveles taxonómicos altos.....	56
Comunidades bacterianas a nivel de género.....	61
Relación entre parámetros operacionales y la estructura de la comunidad bacteriana.....	64
3. SECUENCIACIÓN AL AZAR DE ADN METAGENÓMICO.....	67
Plantas de tratamiento de efluentes analizadas.....	67
Descripción general de los datos generados por secuenciación al azar.....	67
Riqueza taxonómica y funcional en lodos activados.....	73
Perfil de categorías funcionales en lodos activados.....	75
Validación a través del ensamblado de lecturas metagenómicas.....	81
4. ANÁLISIS DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES.....	85
Integrones y plásmidos de amplio rango de hospedadores.....	85
Arreglos de cassettes génicos en integrones de clase 1.....	86
<b>Discusión.....</b>	<b>88</b>
Diversidad taxonómica.....	88
Diversidad en el potencial fenotípico y el contenido de GC.....	93
Elementos genéticos móviles en lodos activados.....	97
Riqueza de taxones y categorías funcionales.....	98
Variables de operación y la estructura de la comunidad microbiana.....	100
Implicancias en la operación.....	104
<b>Comentarios finales.....</b>	<b>107</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>108</b>
ANÁLISIS DEL SESGO POR AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL.....	108
Materiales y Métodos.....	108
Resultados.....	109
Discusión.....	110
ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE.....	111
PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES.....	113
Calidad de datos.....	113
Tablas de valores de abundancia relativa.....	115
<b>Referencias.....</b>	<b>123</b>

# Glosario

<b>PTE</b>	Plantas de tratamiento de efluentes
<b>ARNr 16S</b>	Gen de ARN ribosomal 16S
<b>OTUs</b>	Unidades taxonómicas operacionales
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>EGMs</b>	Elementos genéticos móviles
<b>GC</b>	Guanosina-Citosina
<b>DBO</b>	Demanda biológica de oxígeno
<b>TRS</b>	Tiempos de retención de sólidos
<b>MLSS</b>	Sólidos suspendidos en licor mezcla
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto

# Introducción

## Uso del agua y tratamiento de efluentes

El agua es un recurso vital y cumple un rol central en la sociedad. Ya sea para el consumo domiciliario como para diversos procesos industriales, existe hoy una explotación intensa del recurso hídrico, que permite sostener la organización urbana moderna. Su utilización suele estar asociada a la generación de aguas residuales o efluentes, caracterizados por el exceso de materia orgánica, de macro y microcontaminantes inorgánicos, incluyendo metales pesados, por la presencia de microorganismos patógenos, y por ser líquidos turbios, con color y olor. Es evidente la importancia de realizar un manejo adecuado de los efluentes, para no poner en jaque el ecosistema receptor (Grady Jr et al., 2011). El tratamiento de efluentes, enmarcado dentro del área de la ingeniería ambiental, constituye uno de los pilares del cuidado ambiental actual.

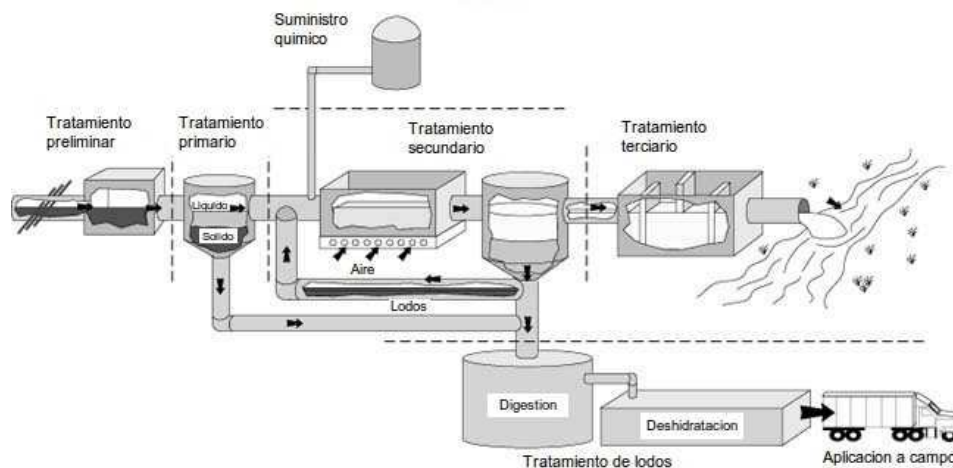
El saneamiento, en un estrecho vínculo con la salud pública, previene el contacto de la población con cualquier tipo de desecho. Entre sus numerosas actividades, se ocupa de la recolección y depuración de los líquidos cloacales, una práctica fundamental para proteger a la población de posibles brotes asociados a microorganismos patógenos fecales (Hunter et al., 2002), así como a los cuerpos de agua de la contaminación y la consecuente degradación ambiental. La Organización de las Naciones Unidas incluyó el saneamiento en los Objetivos de Desarrollo del Milenio (UN, 2000), en donde expresa la voluntad de reducir a la mitad la proporción de la población sin un acceso sostenible a agua potable segura ni a un saneamiento básico. El desafío, sin embargo, no está sólo en conectar a la población con una red de cloacas y con soluciones ambientales en general, sino también en hacerlo de manera sustentable. El sistema de colectores cloacales y de plantas de tratamiento de efluentes tienen una capacidad comprobada de transportar y remover nutrientes, contaminantes orgánicos y agentes patógenos. Sin embargo, lo hacen a costos energéticos altos, requieren una operación y un mantenimiento adecuados, y un amplio conocimiento del proceso subyacente (Henze, 2008).

En Argentina, el escenario del saneamiento es heterogéneo, con grandes variaciones a lo

largo del territorio nacional y, en términos generales, poco desarrollado. En zonas rurales y periurbanas, el tratamiento principal consiste en el uso de pozos ciegos y de cámaras sépticas, que conviven junto a descargas clandestinas en cuerpos de agua o colectores pluviales; mientras que en zonas urbanas se ha ido extendiendo paulatinamente la red cloacal, aunque la cobertura continúa siendo parcial. Según datos del INDEC, 53% de los hogares en todo el país estaban conectados a la red pública de cloacas en el 2010 (INDEC, 2010). La empresa Agua y Saneamientos Argentinos S. A. (AySA), en referencia a su área de cobertura dentro del Área Metropolitana de Buenos Aires, reportó un valor cercano al 60% (AySA, 2010). No obstante, tan sólo una fracción minoritaria (11%) del líquido colectado a nivel nacional es tratada completamente antes de su descarga en cuerpos de agua (FAO-UN / Aquastat, 2010). Dentro del reducido tratamiento practicado en el país, se cuenta con numerosos sitios que tratan efluentes municipales con sistemas de lagunas de estabilización, especialmente apropiadas para poblados pequeños. Las escasas plantas de tratamiento de efluentes municipales de mayor infraestructura comenzaron a surgir hace no más de 20 años, por lo que la trayectoria del país en el campo del tratamiento de aguas servidas continúa en una fase joven si la comparamos con los países industrializados de Europa o América del Norte.

Para los efluentes municipales, el tratamiento convencional incluye cinco etapas: tratamiento preliminar, primario, secundario y terciario, y tratamiento de lodos (Fig. 1). El tratamiento preliminar consiste en un filtrado grueso por un sistema de rejillas y mallas, para luego pasar al tratamiento primario, en el que la materia orgánica particulada de mayor tamaño es separada del líquido entrante por sedimentación, dando origen a los lodos primarios. El efluente con materia orgánica disuelta o en suspensión ingresa al tratamiento secundario, la etapa de oxidación biológica – en donde la materia orgánica biodegradable es transformada en CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) y biomasa – y para la cual existen diversas configuraciones posibles. La más frecuente, conocida como tratamiento por “lodos activados”, consiste en un reactor o tanque de aireación abierto con microorganismos en suspensión, seguido de un separador de fases, ya sea un sedimentador (clarificador secundario) o un sistema de membranas (MBR), del cual una fracción retorna al reactor para mantener un nivel de sólidos en suspensión relativamente constante (recirculación), y otra es purgada (lodos secundarios

excedentes). Alternativamente, existen sistemas de lechos percoladores (procesos de película fija), con microorganismos adheridos sobre la superficie de sustratos particulados, y sistemas híbridos, que incluyen tanto procesos en suspensión como en *biofilm* (MBBR, del inglés Moving Bed Biofilm Reactor). Aunque no siempre presente, el tratamiento terciario consiste en asegurar la eliminación de microorganismos patógenos, así como de nutrientes (nitrógeno, fósforo) y micro-contaminantes que no hayan sido depurados en la etapa biológica. Por último, los lodos primarios, junto con los lodos secundarios excedentes de la etapa de oxidación biológica, son procesados por separado con el fin de concentrarlos, estabilizarlos y deshidratarlos para su disposición final (Lue-Hing, 1998; Henze, 2008).



**Figura 1:** Esquema general del tratamiento de efluentes municipales (Modificado de: [www.rpi.edu](http://www.rpi.edu)). El suministro químico se realiza eventualmente en plantas diseñadas para la remoción de nutrientes. Existen múltiples métodos para el tratamiento de lodos, al mismo tiempo que su aplicación a campo no es arbitraria sino que se realiza en ambientes controlados y contenidos (por ejemplo, *landfarming*).

La industria, por su lado, genera un volumen de agua residual de una magnitud comparable con la fracción municipal. En Argentina, consume 11% del agua total extraída, mientras que el sector municipal, 15% (FAO-UN / Aquastat, 2010). Numerosas actividades industriales se valen del recurso hídrico, ya sea para su proceso productivo en sí, o para la limpieza de sus instalaciones y equipos. Las normativas vigentes en nuestro país, aunque diferentes en cada provincia, exigen un tratamiento del efluente *in situ* (en la provincia de Buenos Aires, Ley 25.612 de Gestión Integral de Residuos

Industriales, Capítulo 3, Inciso D). Dependiendo del tipo y del caudal, existen métodos físicos, químicos y biológicos para su tratamiento.

En la industria, la diversidad de procesos y tipos de efluentes exigen algunas variantes, especialmente en cuanto al tratamiento primario. A diferencia de un efluente domiciliario, en la industria abundan aguas residuales de alta concentración de materia orgánica, que pueden variar entre sustancias recalcitrantes o fácilmente biodegradables, así como altas concentraciones de sales. El tratamiento primario por sedimentación es poco frecuente, mientras que puede ser necesario un pretratamiento físico y/o químico para eliminar metales pesados o el exceso de grasas y aceites, modificar la temperatura o el pH del efluente de ingreso a la planta, o bien modular su carga orgánica por medio de un ecualizador. Este tipo de medidas evitan que la biomasa activa vea alterada su función por golpes bruscos en sus condiciones en el reactor. Por otra parte, la carga cloacal dentro del efluente industrial puede llegar a ser nula, en cuyo caso un tratamiento terciario diseñado para la eliminación de patógenos sería innecesario.

El crecimiento de la población y la industrialización en zonas urbanas y sus alrededores representa un fuerte aumento en la capacidad de carga del ecosistema circundante. Prevenir la contaminación de los cuerpos de agua de descarga es crucial para asegurar la sustentabilidad del desarrollo local. Sin embargo, la ampliación de la red cloacal, así como el número, la diversidad y la escala de las instalaciones industriales hacen que el tratamiento de efluentes sea un proceso complejo y costoso. Por cada planta de tratamiento (PTE), ya sea industrial o municipal, se manejan enormes caudales (en el orden de los  $m^3/seg$ ), sujetos a variaciones en el flujo y en sus condiciones físicoquímicas en el corto y largo plazo (especialmente dentro de la actividad industrial), haciendo indispensable la implementación de sistemas de tratamiento confiables y robustos.

### **El proceso de lodos activados y la ecología**

El sistema de lodos activados es actualmente el método más utilizado en el mundo, tanto para el tratamiento de efluentes municipales como industriales (Seviour et al., 2010; Sheik et al., 2014). Se trata de un proceso biológico que ha cumplido un siglo desde su descripción inicial, convirtiéndose en una de las bio-tecnologías actuales con mayor

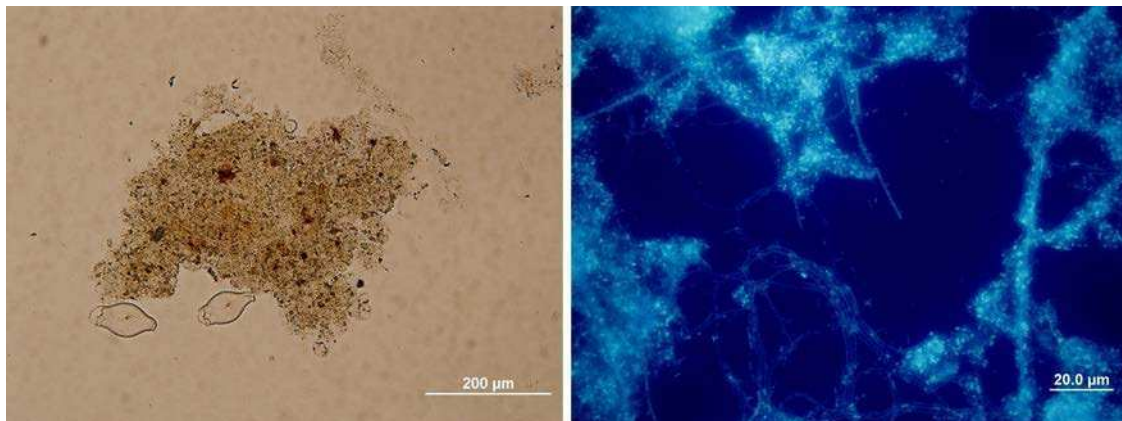
recorrido (Ardern y Lockett, 1914). El sistema se sustenta en el autoensamblado de una comunidad microbiana activa, con capacidad de formar agregados floculentos que son separados del efluente tratado por sedimentación y devueltos parcialmente al reactor biológico (Fig. 2). Numerosos estudios han mostrado que los sistemas de lodos activados contienen una comunidad microbiana altamente diversa y dinámica, en donde las bacterias son los organismos mayoritarios y responsables de la remoción de materia orgánica, microcontaminantes y nutrientes (Dignac et al., 2000; Figuerola y Erijman, 2007; Zhang et al., 2012; Nielsen y McMahon, 2014), en convivencia con protozoarios, pequeños metazoarios (rotíferos, nematodos y microcrustáceos) y virus bacterianos (bacteriófagos) (Johnke et al., 2014). En este ecosistema artificial, ellos conforman una comunidad compleja (Fig. 3).



**Figura 2:** Esquema general del sistema de lodos activados convencional (Modificado de: [www.ewisa.co.za](http://www.ewisa.co.za))

Profundizar el conocimiento ecológico de los sistemas de lodos activados puede brindar mejoras a la ingeniería del proceso y estrategias para una mayor eficiencia en términos de energía (Graham y Smith, 2004). En este sentido, se han realizado trabajos fundamentales sobre la teoría de la utilización diferencial de los recursos (Tilman, 1982), las dinámicas de crecimiento no lineales (May, 1973) y la biogeografía de islas (Curtis et al., 2003). Sin embargo, aún no se ha alcanzado un grado suficiente de comprensión y predicción que permitan el control absoluto del proceso de lodos activados, ni de ningún otro sistema biotecnológico basado en comunidades complejas.





**Figura 3:** El *floc* del sistema de lodos activados. Con diámetros en el orden de  $10^2 \mu\text{m}$ , se sustenta en una compleja matriz estructural con interacciones físicas, químicas y biológicas. Las fotografías, que fueron tomadas por el autor, son de carácter ilustrativo y no se corresponden entre sí.

La ecología general busca explicar y predecir fenómenos tales como los patrones de diversidad temporal y espacial de los organismos vivos y sus interacciones tróficas. Además se encarga del estudio del ensamblado de comunidades, en donde aborda preguntas relacionadas con los procesos y mecanismos que dan origen a una comunidad, con factores y condiciones que definen el ensamblado de una comunidad determinada, o bien con la influencia del proceso sobre las diversas funciones de una comunidad. Asimismo, estudia procesos ecológicos como la competencia, el filtrado del hábitat, los efectos históricos y los procesos neutrales (Prosser et al., 2007).

Otro objetivo de la ecología general consiste en desentrañar las relaciones entre la estructura y la función de la comunidad, y entre su estructura y su estabilidad. La función puede definirse como una actividad asociada a una comunidad, como por ejemplo, la fijación de nitrógeno, la resistencia a la invasión o la retención de humedad, entre otras. Frente a las alteraciones que sufren los ecosistemas y la alta tasa de extinción de especies en la actualidad, un interrogante que continúa siendo pertinente es si comunidades con diferentes estructuras pueden llevar a cabo una misma función. La estabilidad refiere a la habilidad de una comunidad de preservar su estructura y/o su función nativa en el tiempo (Robinson et al., 2010).

Las comunidades microbianas son sistemas apropiados para poner a prueba diversas hipótesis ecológicas, especialmente desde los avances en el campo de la biología

molecular ambiental. La presencia, la ausencia y las fluctuaciones de grupos microbianos específicos pueden ser utilizadas para determinar los efectos de fuerzas externas e internas sobre la comunidad toda (Robinson 2010). En los últimos años se han ampliado los horizontes microbianos en ecosistemas naturales, tanto convencionales como extremos, así como en ecosistemas artificiales (bio-reactores) (Tyson et al., 2004; Tringe et al., 2005; Roesch et al., 2007; Biers et al., 2009; Zhang et al., 2012; DeLeon-Rodriguez et al., 2013; Eren et al., 2013; Fernández et al., 2014). Dentro de las comunidades microbianas de ecosistemas naturales, la microbiota humana, en particular la del tracto intestinal, ha sido una de las más intensamente estudiadas, con resultados que han enriquecido el campo de investigación de la ecología microbiana en general, y le han dado una nueva perspectiva al área biomédica básica y aplicada (Ley et al., 2008; Muegge et al., 2011; The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Sin embargo, las comunidades microbianas asociadas a hospedero, como la microbiota humana, cuentan con la particularidad de estar atravesadas por factores selectivos de coevolución, un aspecto adicional en el ensamblado de la comunidad que podría aumentar la variabilidad de los censos (Chung et al., 2012; Hacquard et al., 2015).

El sistema de lodos activados no sólo es un ecosistema artificial, por lo que carece de la faceta coevolutiva con un hospedero, sino que además presenta límites bien definidos, sus variables físicoquímicas se encuentran monitoreadas, su distribución a lo largo del planeta es amplia, y se trata de una tecnología conocida y bien establecida, hechos que lo convierten en un atractivo sistema de estudio (Daims et al., 2006). Conocer los principios del ensamblado de la comunidad microbiana puede ser clave en la comprensión de los factores que determinan la estructura de la comunidad y en la predicción de respuestas frente a cambios o perturbaciones externas, escenarios frecuentes en plantas de tratamiento de efluentes (Ramette y Tiedje, 2007). Contribuye, además, en aspectos fundamentales del esfuerzo para la reutilización de los recursos contenidos en los efluentes (Sheik et al., 2014). La interacción entre la biotecnología ambiental, la ecología microbiana y la biología molecular han generado un nuevo campo de investigación que todavía se encuentra en proceso de maduración, cuyo desafío consiste en superar los estudios meramente descriptivos para comenzar a comprender en profundidad la ecología de la microbiota de los ecosistemas biotecnológicos.

### **Ensamblado de comunidades microbianas**

Las comunidades microbianas en el ambiente pueden estar compuestas por miles de especies que, en su mayoría, escapan al crecimiento aislado en laboratorio (Quince et al., 2008). Hasta la aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo no se conocía la distribución de los taxones y de las funciones presentes en muestras ambientales. Estas técnicas, en su conjunto, han dado lugar al pleno desarrollo de la ecología microbiana y a un avance en la ecología general, ya que brindaron la posibilidad de trabajar con muestras con alto número de individuos de múltiples ecosistemas (Amann et al., 1995; Barberán et al., 2014).

Hasta hoy, las comunidades microbianas han sido estudiadas con un enfoque originado en la ecología de comunidades de animales y plantas, hecho sustentado en la observación de ciertas congruencias en sus patrones biogeográficos. En cuanto al perfil de distribución de abundancias, por ejemplo, se ha observado en ambos grupos una dominancia de unos pocos taxones, acompañados de numerosas especies de baja abundancia, aunque la porción de taxones minoritarios (la cola de la distribución) es más extensa en comunidades microbianas (Curtis et al., 2002; McGill et al., 2007; Szabo et al., 2007; Caporaso et al., 2012). También se han detectado coincidencias en la relación distancia-decaimiento, que implica un incremento de la disimilitud entre comunidades a distancias crecientes, debido a un recambio de taxones a lo largo del espacio, (Horner-Devine et al., 2004; King et al., 2010). Otro aspecto se refiere a las relaciones filogenéticas dentro de la estructura de la comunidad, para lo cual se ha determinado que los organismos tienden a agruparse, generalmente, entre taxones filogenéticamente cercanos (Horner-Devine y Bohannan, 2006; Bryant et al., 2008; Chaffron et al., 2010). No obstante, más allá de estas coincidencias destacables, los microorganismos no replican el patrón global de abundancias de plantas y animales, con el clásico gradiente creciente hacia el Ecuador, y decreciente con la altitud (Fierer y Jackson, 2006; Corby-Harris et al., 2007; Lauber et al., 2009; Fierer et al., 2011; Flombaum et al., 2013). No hay que olvidar las numerosas singularidades que caracterizan a los microorganismos, como su enorme capacidad de dispersión (pasiva), la posibilidad de entrar en estado de latencia, su veloz adaptación fisiológica ante cambios en el ambiente, su vasta diversidad genética que dificulta la definición de “especies”, su alta tasa de intercambio de material genético y una rápida evolución. En

definitiva, las escalas espaciales y temporales de las comunidades microbianas difieren fuertemente de las del resto de los organismos, y abordarlas de manera apropiada puede ser un desafío mayor (Balser et al., 2006; Nemergut et al., 2013).

Todos los patrones biogeográficos observados son originados y moldeados por procesos o mecanismos ecológicos, siendo cuatro los exponentes principales: diversificación *in situ*, dispersión, selección ambiental y deriva ecológica, que actúan en forma combinada y con una influencia que varía a lo largo del ambiente y el tiempo (Vellend, 2010). Los dos primeros son las fuerzas responsables de la aparición de nuevos organismos en la comunidad, mientras que los últimos afectan la presencia y la ausencia de especies, así como su abundancia relativa en el tiempo. Este marco teórico les otorga un rol importante a las fuerzas evolutivas en relación a la ecología de comunidades y al mismo tiempo, permite la consideración de que todos los procesos actúen en simultáneo, evitando así la polarización entre procesos determinísticos (procesos basados en teoría de nichos) y estocásticos (procesos enmarcados en la teoría neutral) (Wennekes et al., 2012).

El mecanismo de selección ambiental es una fuerza preponderante en el ensamblado de comunidades microbianas en general, hecho evidente al estudiar comunidades de hábitats dispares, en los que se detectan claras diferencias entre poblaciones de microorganismos en simultáneo con disparidades evidentes en salinidad, pH, temperatura, luz, nutrientes y fuentes de carbono (Tringe et al., 2005; Caporaso et al., 2011). Al mismo tiempo, se supone que las interacciones bióticas, como la competencia, el comensalismo, el mutualismo y el parasitismo, así como los circuitos de retroalimentación positiva y negativa (Lozupone et al., 2012) dictaminan el destino o la abundancia de numerosos microorganismos. El conocimiento detallado sobre su influencia en comunidades complejas aún es escaso, debido a la dificultad para determinar este tipo de interacciones a escala microbiana (Embree et al., 2015). Por el contrario, en ambientes con baja intensidad de selección, comunidades pequeñas son más propensas a ser afectadas por procesos de deriva ecológica o estocasticidad demográfica, lo que puede llevar principalmente a la extinción de organismos con baja abundancia (Chase y Myers, 2011). La dispersión de microorganismos, típicamente pasiva, es difícil de medir, por lo que se suele estimar a partir de la distribución observada. Las masas de aire atmosférico y el agua de los océanos transportan

poblaciones microbianas a escala planetaria (Brodie et al., 2007; DeLeon-Rodriguez et al., 2013; Sunagawa et al., 2015), lo que podría dar sustento a la antigua y simple hipótesis de Baas Becking de que “todo está en todos lados, pero el ambiente selecciona” (Baas-Becking, 1934). Sin embargo, se necesitarían ciertas características para sobrevivir a las condiciones en el transcurso de la dispersión, lo que sería un impedimento para una movilidad ilimitada de los microorganismos de la Tierra. Además, el planeta no es un sistema de mezcla completa, dadas sus características meteorológicas, hidrológicas y geográficas, y aunque lo fuera, ciertos cálculos indican que el tiempo necesario para que todos los microorganismos transiten la totalidad del espacio disponible superaría la edad geológica de la Tierra (Papke y Ward, 2004). En cuanto a la diversificación o aparición de nuevas especies dentro de la misma comunidad, se considera que es un proceso de baja magnitud a corto plazo, aunque se sabe que numerosos microorganismos han presentado altas tasas de mutación (Hansen et al., 2007), así como también se conoce el impacto de la transferencia horizontal de genes, una manifestación concreta e inmediata, con capacidad de modificar la dinámica del ensamblado de la comunidad (Thomas y Nielsen, 2005; Polz et al., 2013). Estos cuatro procesos actúan en simultáneo y su aporte relativo varía según el tipo de ambiente y de comunidad, dependiendo de la presencia de perturbaciones (como cambios fisicoquímicos o invasiones), y según la escala temporal y la escala espacial utilizadas (Costello et al., 2012).

Un punto de discusión es si el ensamblado de las comunidades microbianas por el mecanismo de selección ocurre en base a taxones o a características funcionales (Green et al., 2008). Si se realizara en base a capacidades funcionales, las comunidades microbianas de ambientes idénticos podrían variar su composición taxonómica, siempre y cuando mantengan las funciones necesarias requeridas para la supervivencia en el medio. Se han reportado casos de alta variación a nivel de organismos, en simultáneo con un importante número de funciones compartidas, las cuales han sido identificadas como un *core* a nivel de genes (Turnbaugh et al., 2009; Burke et al., 2011).

Los mecanismos ecológicos también podrían estar actuando sobre la distribución de propiedades nucleotídicas y genómicas. Las mismas pueden ser obtenidas a partir de información metagenómica, y son potencialmente útiles como marcadores ecológicos (Barberán et al., 2012). Se incluyen, entre otros, el tamaño efectivo de los genomas, el

número de copias de ARNr por genoma, el número de genes por genoma, el uso de codones y aminoácidos, y el contenido de guanosina-citosina (GC) y su variabilidad. En cuanto a la utilidad ecológica, se ha detectado, por ejemplo, una correlación positiva entre el tamaño del genoma y la abundancia de GC, con los típicos habitantes del suelo en el extremo superior (grandes genomas y alto contenido de GC), y los hospedadores obligados en el extremo opuesto (Rocha y Danchin, 2002; Bentley y Parkhill, 2004), aunque los fundamentos de la distribución del contenido de GC a lo largo de los organismos y los ambientes no están del todo esclarecidos (Wu et al., 2012; Reichenberger et al., 2015).

Por último, también es posible que los procesos ecológicos que impulsan el ensamblado de comunidades microbianas influyan sobre la estructura del moviloma (y viceversa), entendido como el conjunto de elementos genéticos móviles (EGMs) del dominio procarionota, como los plásmidos y los *cassettes* génicos, entre otros (Koonin y Wolf, 2008). Propuestos como piezas clave para que las poblaciones microbianas enfrenten y superen las adversidades ambientales (Heuer et al., 2008), han sido estudiados y detectados en sistemas biológicos de tratamiento, en donde se los ha asociado principalmente a genes de resistencia a antibióticos (Parsley et al., 2010; Yang et al., 2013). Sin embargo, es de esperar que en sistemas biológicos de tratamiento de efluentes y en sitios contaminados, las funciones codificadas en los EGMs confieran capacidades adicionales, como por ejemplo, genes de enzimas catabólicas de sustratos inusuales (Koenig et al., 2009).

Los *cassettes* génicos son elementos simples que consisten en moléculas pequeñas de ADN que contienen usualmente un marco abierto de lectura, bordeado por un sitio de recombinación específica asociado a *cassette* (conocido como elemento de 59 bases o *attC*), lo que le otorga la capacidad de integrarse a un genoma en un sitio específico (*attI*) por acción de la integrasa del integrón (IntI). Esta inserción permite la expresión del *cassette* entrante a partir del promotor del integrón (Pc). El sitio *attI*, el gen de la integrasa IntI y el promotor Pc son los 3 componentes básicos de los integrones (Gillings, 2014). La mayor parte de los integrones de clase 1 portan en su zona variable un gen interrumpido de resistencia a moléculas catiónicas tóxicas (*qacEΔI*), seguido de un gen de resistencia a sulfonamidas (*sulI*). Una gran parte de los estudios se ha enfocado en cepas de relevancia clínica, en las que se observó la acumulación de genes

de resistencia a antibióticos en un arreglo de *cassettes* génicos (Rowe-Magnus et al., 2002; Mokracka et al., 2012). Sin embargo, recientemente se le ha reconocido su papel en el campo ambiental, al haber sido propuesto como un estimador de la contaminación antropogénica (Gillings et al., 2015).

Los plásmidos, por su parte, son EGMs centrales para el dominio *Bacteria* (Ochman et al., 2000). Entre ellos existen algunos con capacidad de replicar en y transferirse a numerosos hospederos, con el potencial de afectar fuertemente la fisiología y sobrevivencia de las poblaciones bacterianas en el ambiente (Heuer y Smalla, 2012). Los plásmidos del grupo de incompatibilidad P (IncP-1), en particular, se caracterizan por cubrir un amplio rango de bacterias Gram-negativas (Adamczyk y Jagura-Burdzy, 2003). Su estructura básica está conservada y contiene genes de mantenimiento de plásmido así como de transferencia por conjugación (Jechalke, Schreiter, et al., 2013). Además, pueden poseer genes accesorios que varían entre resistencias a antibióticos, resistencias a compuestos cuaternarios de amonio, resistencias a metales, o bien rutas de degradación. Por esto último, han sido asociados a eventos de contaminación ambiental (Vedler et al., 2004; Smalla et al., 2006; Heuer et al., 2012).

En resumen, el ensamblado de comunidades microbianas es un proceso complejo con diferentes mecanismos actuando en simultáneo que puede ser abordado sistemáticamente desde diferentes perspectivas, como la diversidad filogenética o taxonómica, la diversidad genética, la diversidad de rasgos nucleotídicos y genómicos, o la diversidad de elementos genéticos móviles, entre otras. La información generada por las nuevas herramientas de secuenciación masiva y de bioinformática brindan la oportunidad de llevar a cabo estudios amplios y exhaustivos sobre una combinación de perspectivas, lo que podría acelerar la comprensión del funcionamiento de las comunidades microbianas en general, y de los procesos biotecnológicos en los que están involucradas en particular.

### **Comunidades microbianas en lodos activados**

El conjunto de capacidades funcionales integradas en el tiempo y en el espacio, junto a las propiedades emergentes, y en combinación con los componentes abióticos, dan origen a la función de la comunidad y/o del ecosistema. A las comunidades microbianas,

por ejemplo, se les asignan funciones fundamentales en los ciclos biogeoquímicos del planeta, con una influencia directa sobre el resto de los seres vivos. En relación a lo expuesto previamente, es válido preguntarse cuán relevante es conocer “quiénes están” para poder entender “qué están haciendo”. Estudios recientes indican que la composición de las comunidades influye sobre la función en un variado conjunto de ecosistemas (Lozupone y Knight, 2007; Nemergut et al., 2013). En lodos activados, en donde la función está definida principalmente por la eliminación de materia orgánica y nutrientes contenidos en el efluente, de patógenos y de turbidez, es decisivo comprender estas relaciones.

Al igual que en las comunidades microbianas en general, la teoría ecológica del ensamblado en lodos activados no ha alcanzado modelos predictivos que abarquen la totalidad del proceso. Aún quedan múltiples interrogantes en relación a la influencia e interacción de los mecanismos ecológicos diversificación *in situ*, dispersión, selección ambiental y deriva ecológica, lo que ayudaría a comprender aspectos de la dinámica temporal (Van Der Gast et al., 2008), la relación entre la estructura y la función (Briones y Raskin, 2003), y la proliferación de grupos bacterianos que interfieren en el proceso de tratamiento (Nielsen et al., 2009).

Gracias a procesos de dispersión, las comunidades de lodos activados se autoensamblan valiéndose de los microorganismos nativos del propio efluente y del ambiente circundante, ya que son sistemas abiertos. No obstante, es frecuente – aunque no necesario – inocular al sistema un lodo proveniente de otras instalaciones, con el objetivo de acelerar el así llamado arranque de planta. Pero, ¿cuándo y cómo se define, si es que se define, una comunidad climax? ¿Y en cuánto difieren las comunidades de lodos activados de plantas de tratamiento distanciadas geográficamente? ¿Influye el tipo de inóculo, en caso de utilizarse, en el ensamblado de la comunidad? Por último, ¿cuáles son las variables ambientales y de proceso que más influyen en determinar la estructura de la comunidad?

Desde los inicios de la tecnología de lodos activados hasta el día de hoy, el microscopio ha sido una de las principales herramientas para observar y cuantificar la composición de la comunidad microbiana (Eikelboom y Van Buijsen, 1983). De baja utilidad para desentrañar la enorme diversidad bacteriana y viral, estas observaciones han permitido sin embargo delinear la secuencia de armado del *floc* biológico y formular hipótesis de



sucesión biológica en base a la dinámica y la distribución de abundancias de protozoarios y pequeños metazoarios en búsqueda de indicadores (Pike y Curds, 1971). Esto llevó posteriormente a la creación de un índice que vincula el estado de la sucesión biológica con el funcionamiento de la planta de tratamiento, medido en términos de reducción de la turbiedad y de remoción de materia orgánica y nutrientes (Madoni, 1996). Sin embargo, no hay que olvidar que las bacterias componen más del 95% de la biomasa de lodos activados y que son sus capacidades metabólicas las que permiten un exitoso funcionamiento del sistema. Estudios de patrones moleculares en base al gen de ARNr 16S han caracterizado al inicio de funcionamiento de planta como un período de alto recambio y baja *performance*, hasta alcanzar una comunidad más estable en unidades taxonómicas y en función (Hoshino et al., 2006; Van den Broeck et al., 2009; Xiuheng et al., 2009). No obstante, una vez que la planta de tratamiento ha sido puesta en marcha, es posible que la comunidad bacteriana sufra oscilaciones en su estructura. La fluctuación de taxones bacterianos ha sido detectada en numerosas ocasiones y acontece en condiciones normales de correcto funcionamiento de la planta de tratamiento (Kaewpipat y Grady, 2002; Ayarza et al., 2010; Wang et al., 2011). Wells y colaboradores, por su parte, determinaron por T-RFLP un comportamiento más acorde a una sucesión gradual que a una periodicidad alrededor de un “equilibrio” (Wells et al., 2011).

Las plantas de tratamiento municipal, así como algunas industriales, reciben efluentes cloacales. Se ha estudiado el impacto que tienen las bacterias fecales del efluente sobre el ensamblado de la comunidad de lodos activados, y se hallaron diferencias sustanciales entre los patrones de abundancia bacteriana entre el líquido de ingreso, los lodos activados, y el líquido de salida (McLellan et al., 2010; Ye y Zhang, 2013; Hashimoto et al., 2014; Saunders et al., 2016). En lo que podría ser atribuido a un proceso de selección ambiental, la circulación por los colectores cloacales, y especialmente el tiempo de permanencia en la cámara de aireación de la PTE, enfrentan a las bacterias a un escenario notoriamente diferente al del intestino, y se promueve el crecimiento de nuevos grupos que prevalecen por sobre y a costas de aquellas de origen fecal, con lo que se logra la reducción o eliminación de especies patógenas (Wen et al., 2009).

La aplicación de nuevas tecnologías, como los microarreglos y las tecnologías de

secuenciación masiva (secuenciación de alto rendimiento), permitió explorar la diversidad microbiana en lodos activados de una forma sin precedentes, y colaboró en profundizar el estudio del ensamblado de las comunidades. Trabajos publicados en los últimos años, basados en microarreglos filogenéticos o en la secuenciación de amplicones (*amplicon-sequencing*, en inglés) correspondientes a fragmentos del gen de la subunidad 16S de ARN ribosomal (ARNr 16S), mostraron que las comunidades de reactores que tratan efluentes municipales, aún con diferencias en su ubicación geográfica y en la configuración de sus instalaciones, son notoriamente similares a nivel de filo bacteriano (Xia et al., 2010; Hu et al., 2012; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2012), sugiriendo una consistencia con lo propuesto por Philipotts y colaboradores en cuanto a una coherencia ecológica en *Bacteria* a rangos taxonómicos altos (Philipotts et al., 2010). En particular, estos relevamientos en lodos activados destacaban la dominancia del filo *Proteobacteria*, con sus clases *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, seguido de grupos tales como *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

A pesar de la tendencia creciente de combinar efluentes domésticos e industriales para tratarlos luego en plantas municipales, la necesidad de tratar aguas residuales industriales continúa siendo un asunto crítico a nivel mundial. Los efluentes industriales comprenden un amplio espectro de compuestos orgánicos, característicos de las múltiples actividades industriales y sus esquemas de producción. Del mismo modo que con el efluente cloacal, la mayoría de las industrias se vale del sistema de lodos activados para tratar sus efluentes, luego de un pretratamiento adecuado, si fuera necesario (Orhon et al., 2009). Sin embargo, el conocimiento sobre la influencia del tipo de efluente sobre sus comunidades bacterianas es escaso. En reactores de lodos activados sujetos a concentraciones de efluentes industriales crecientes, se observó que el componente determinístico del ensamblado de la comunidad aumentaba con la concentración de efluentes industriales (Van Der Gast et al., 2008). En cuanto a la composición de la comunidad, estudios previos en lodos activados industriales mostraron la prevalencia de filos bacterianos tales como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Juretschko et al., 2002; Bramucci y Nagarajan, 2006; Figuerola y Erijman, 2007; Degenaar et al., 2008). Este patrón no difiere en forma sustancial del que se encuentra en plantas de tratamiento municipales. Sin embargo,

estos estudios han estado limitados al análisis de tan sólo unas centenas de clones del gen ARNr 16S, y además no buscaron relacionar la estructura de la comunidad bacteriana con las características del efluente y los parámetros operacionales de la planta.

Los factores ambientales dados por la configuración de la planta depuradora y sus variables de operación deben ser tenidos en consideración a la hora de evaluar las reglas de ensamblado de la comunidad de lodos activados. El tiempo de retención de sólidos (TRS), también conocido como tiempo de retención celular, es un parámetro central en el diseño y el funcionamiento de la planta, que no debe ser confundido con el tiempo de retención hidráulico, cuyo significado remite al tiempo de permanencia del líquido a tratar en el sistema y el cual no es relevante en el diseño de la PTE (Grady Jr et al., 2011). Diferentes reportes han vinculado variaciones en el TRS con cambios en la estructura y/o función de la comunidad microbiana (Saikaly et al., 2005; Pholchan et al., 2010; Kim et al., 2011; Vuono et al., 2015). Las plantas de tratamiento con remoción de nitrógeno son casos ampliamente conocidos. Sus largos TRS en que operan son esenciales para permitir el mantenimiento de bacterias nitrificantes en el sistema, cuyo crecimiento es notoriamente lento debido a restricciones energéticas en su metabolismo (Wiesmann, 1994).

Por otro lado, las cámaras de aireación registran valores variables para el ingreso de demanda biológica de oxígeno (DBO), y de demanda química de oxígeno (DQO, mayor que la DBO; su cociente es útil para estimar la biodegradabilidad del efluente), la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura, el pH, la salinidad, el potencial de óxido-reducción, el cociente F/M (del inglés *food* y *microbes*) y una cantidad relativamente constante de sólidos totales en suspensión. Además, las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo varían según el agua residual a tratar, presentando las primeras mayor o menor grado de biodegradabilidad y de diversidad. Por último, la tasa de alimentación (ingreso de efluente a la cámara de aireación) puede variar entre continua o intermitente. Todas estas variables, individualmente y de forma combinada, ejercen una selección ecológica abiótica que afecta la estructura y la dinámica de la comunidad microbiana (Paul et al., 1998; Çiggin et al., 2011; Valentín-Vargas et al., 2012). Al estudiar estos sistemas, es posible hallar asociaciones entre parámetros de operación y perfiles moleculares de comunidades bacterianas, aunque con la limitación

de no poder afirmar una causalidad (Wells et al., 2011; Wang et al., 2012).

### **Potencial fenotípico de las comunidades microbianas**

Estudiar el potencial fenotípico codificado en el conjunto de genomas (metagenoma) expone de forma relativamente directa propiedades microbianas relevantes para la función del ecosistema (Green et al., 2008). En lodos activados, particularmente, se puede comenzar a elucidar cómo los perfiles taxonómicos son estructurados por variables ambientales y por parámetros del proceso de tratamiento. Aunque se trata de una estrategia cuyos resultados son incipientes, debido a los grandes volúmenes de datos y a bases de datos genómicas aún incompletas, y aunque no carezca completamente de sesgos técnicos (Ross et al., 2013), la metagenómica por secuenciación masiva al azar (*shotgun-sequencing*, en inglés) se presenta como una alternativa sin precedentes para acceder al contenido genético de comunidades microbianas complejas (Albertsen et al., 2013; Howe et al., 2014; Mason et al., 2014; Brown et al., 2015). La posibilidad de asignar fragmentos cortos de ADN a organismos y funciones se incrementa a medida que se secuencian y anotan nuevos genomas microbianos (McIlroy et al., 2015), y que surgen mejoras sustanciales de los procesos de análisis (Nielsen et al., 2014). Desde que se conoció el primer reporte que caracterizó la diversidad genética en una planta de tratamiento de efluentes por la tecnología 454 (Sanapareddy et al., 2009), hasta estudios más recientes que emplearon la tecnología de Illumina (Johnson et al., 2014; Ju, Guo, et al., 2014), la secuenciación metagenómica al azar ha permitido la detección del potencial funcional codificado en los genomas presentes en lodos activados, incluyendo componentes de vías catabólicas fundamentales en el proceso del tratamiento (Fang et al., 2013; More et al., 2014).

Trabajos publicados en los últimos años, en los que se realizaron comparaciones metagenómicas en un amplio espectro de biomas, demostraron que es posible relacionar variaciones en la abundancia de categorías génicas con diferencias en las condiciones ambientales (Dinsdale et al., 2008; Fierer et al., 2012). Los resultados de Fierer y colaboradores, por ejemplo, indicaron una fuerte diferenciación entre los metagenomas de suelos desérticos y los presentes en suelos de bosques, aún con una cobertura de secuenciación y un porcentaje de anotación de secuencias considerablemente bajos.

Ahora bien, aún resta aclarar cuán útiles resultan los datos metagenómicos de secuenciación al azar para distinguir comunidades de ecosistemas funcionalmente más similares, como los lodos activados de distintas plantas de tratamiento. Esto es un asunto de actual discusión dada la reciente sugerencia de que la información acerca del potencial fenotípico de microbiomas intestinales no provee un poder discriminatorio mayor que la información contenida en perfiles taxonómicos derivados de la secuenciación de amplicones (Xu et al., 2014).

# Construcción de la hipótesis

Desentrañar los factores que determinan la estructura de las comunidades microbianas y los mecanismos que conducen a su ensamblado es fundamental para mejorar la gestión del proceso de tratamiento y para proveer un marco conceptual que pueda ser aplicado a comunidades microbianas en otros procesos de biotecnología ambiental. Varios estudios previos realizados en plantas de tratamiento de lodos activados municipales, de diferente configuración y provenientes de sitios geográficamente distantes, sugerían la presencia de taxones bacterianos de alto rango comunes a todos los sistemas estudiados, en forma relativamente independiente del resto de las variables ambientales y de proceso. Las plantas de lodos activados industriales reciben efluentes de composición química muy diferente al efluente de origen domiciliario, pero también están basadas en la floculación en forma de agregados (*flocs*) que permiten la retención de la biomasa en el sistema. En base a estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que la presión de selección dada por la formación de dichos agregados biológicos es el principal determinante ecológico de la composición de la comunidad bacteriana en lodos activados. La hipótesis alternativa es que la estructura de la comunidad microbiana estaría determinada preponderantemente por las características químicas del efluente.

## Objetivos generales

Los objetivos de esta tesis consistieron en comprobar si existe un grupo común (*core*) de taxones bacterianos y funciones en plantas de tratamiento de efluentes municipales e industriales, y determinar cuáles son las variables ambientales y operacionales relevantes en la estructuración de las comunidades bacterianas de los lodos activados en sistemas a gran escala, municipales e industriales.

# Objetivos específicos

Para este trabajo los objetivos propuestos fueron:

1. Comprobar si la similitud en los patrones de distribución de abundancias de rangos taxonómicos altos del dominio *Bacteria*, que han sido observados en plantas de tratamiento de efluentes municipales, se conserva también para sistemas de tratamiento de efluentes industriales.
2. Estudiar la distribución de taxones en plantas de tratamiento de efluentes industriales en relación a los parámetros operacionales del proceso.
3. Comprobar si el análisis del potencial fenotípico a partir de los datos de secuenciación al azar puede complementar al análisis taxonómico por secuenciación de amplicones en la tarea de discriminar diferentes comunidades microbianas presentes en lodos activados.
4. Determinar qué capacidades funcionales pueden ser útiles para dilucidar factores determinantes del ensamblado de comunidades microbianas en lodos activados.
5. Explorar la distribución de elementos genéticos móviles en comunidades de lodos activados en relación a los factores determinantes de su ensamblado.

# Materiales y métodos

## 1. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES Y MUESTREO

### Características de las plantas de tratamiento y sus efluentes

Se tomaron muestras de lodos activados de las cámaras de aireación de 9 plantas de tratamiento de efluentes (PTEs) ubicadas en Argentina. Siete de las plantas fueron muestreadas en al menos dos oportunidades, en tiempos separados por períodos de hasta 5 años. Hay una PTE municipal que cuenta con tres muestras. Las dos PTEs restantes, que trataban agua residual de dos industrias de alimento balanceado para mascotas, fueron muestreadas solo en una oportunidad. La información general, los datos técnicos y las fechas de muestreo se presentan en la tabla 1.

Del conjunto de plantas de tratamiento, siete reciben efluentes industriales. El efluente de la tintorería textil contiene colorantes y sustancias auxiliares que se utilizan en las etapas de la tinción, como ácidos orgánicos, fijadores, anti-espumantes, agentes oxidantes y reductores (ditionito de sodio), hidróxido de sodio y solventes. La refinería de petróleo produce un efluente caracterizado por las altas concentraciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos fenólicos, azufrados y amoníaco. El laboratorio farmacéutico elabora productos dosificados producidos por mezcla de ingredientes activos y excipientes, como diluyentes, saborizantes, aglutinantes, conservantes y antioxidantes. El número de productos manufacturados es amplio, lo que resulta en grandes variaciones en la composición del efluente. Los compuestos presentes en el mismo se encuentran usualmente a bajas concentraciones. Estos incluyen ácidos orgánicos, hidratos de carbono, fosfolípidos, vitaminas y minerales inorgánicos, en tanto que no se producen ni procesan antibióticos. La industria de alimento balanceado para mascotas genera efluentes con alta concentración de grasa animal, proteínas, hidratos de carbono y vitaminas, junto a compuestos de limpieza y desinfección. El efluente proveniente del procesamiento de suero lácteo consiste mayormente en lactosa y proteínas del suero, y se genera a partir de la limpieza de los equipos de filtrado por membrana y de las tuberías. Por su lado, la síntesis de polímeros conlleva la liberación



de un efluente que contiene monómeros de la manufacturación de polietileno y poliuretano.

Las PTEs domiciliarias depuran efluentes de contenido mayormente sanitario, sumado a restos de alimentos y productos de limpieza e higiene personal. Una de las PTE municipales aquí analizada (SWGa) cubre un área residencial relativamente pequeña (3500 hab), lo que ocasiona que el tiempo que transcurre entre la recolección y el tratamiento del efluente sea relativamente corto. Al haber un tiempo breve de permanencia en la red cloacal, sumado a la falta de tratamiento por sedimentación primaria, no debería alcanzarse una disminución notoria de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) previo al tratamiento en la PTE. La depuradora municipal restante (SWGb), por el contrario, consiste en una planta de tratamiento de efluentes típica y de un tamaño considerablemente mayor, que representa el servicio para una población de 300.000 habitantes. Debido a un efectivo pretratamiento y tratamiento primario, la DBO (coloidal y disuelta) de ingreso a la cámara de aireación no supera los 100 mg/L.

Para que los microorganismos de los lodos activados realicen su funciones con alta eficiencia, es esencial que cuenten con un balance apropiado de carbono y nutrientes, siendo nitrógeno y fósforo los de mayor relevancia. En caso contrario, el efluente a tratar debe ser complementado con el objetivo de alcanzar la relación DBO:N:P 100:5:1, la cual es considerada óptima para sistemas aeróbicos (Henze et al., 2001; Maier et al., 2009). La falta de nutrientes puede deberse a que el agua residual provenga de un proceso industrial que no incluya compuestos de fósforo y nitrógeno de relevancia biológica en cantidades significativas. Para las plantas de tratamiento analizadas en esta tesis, la deficiencia de fósforo en el efluente de la refinería y la deficiencia de nitrógeno en el efluente de la tintorería se corregían por el agregado de ácido fosfórico y de urea, respectivamente. En las PTEs restantes, la relación DBO:N:P era adecuada o poseían un exceso de nutrientes respecto a la materia carbonácea. Normalmente, en los casos en los que los efluentes portan altas concentraciones de N o P, se requiere contar con instalaciones especialmente diseñadas y operadas a fin de reducir dicho excedente (Wiesmann, 1994; Nielsen et al., 2012).

Ninguna de las PTEs estaba diseñada para la remoción de nutrientes, con excepción de la planta depuradora en la refinería de petróleo, que contenía una cámara anóxica para la desnitrificación. Sin embargo, debido a la baja relación C:N, la eficiencia de remoción de nitrógeno era baja, por la limitación de una fuente de electrones para la desnitrificación.

**Tabla 1:** Información general y técnica de las PTEs. Las muestras que fueron analizadas por pirosecuenciación de amplicones y por secuenciación al azar se encuentran resaltadas en negrita. El caso excepcional es 'SwgA', cuya muestra del 2009 fue analizada por pirosecuenciación, y la del 2013 por secuenciación al azar.

Rótulos	Ubicación	Fecha muestreo	Tipo de efluente	Configuración	Sistema de aireación	Tratamiento primario	Población servida (PE)
<b>PtcA-09</b> <b>PtcA-11</b>	AMBA	May-2009 May-2011	Petroquímico (Refinería de petróleo)	Anóxico/ Aeróbico	Aireación por difusores	Flotación por aire disuelto (DAF)	15.000 (PE)
<b>PtcB-08</b> <b>PtcB-09</b>	AMBA	Sep-2008 May-2009	Petroquímico (Síntesis de polímeros acrílicos)	Aeróbico	Aireación por difusores	Ecuilización	450 (PE)
<b>Txt-08</b> <b>Txt-11</b>	AMBA	Sep-2008 Jun-2011	Tintorería textil	Aeróbico	Aireador de superficie de baja velocidad	Neutralización	25.000 (PE)
<b>Why-10</b> <b>Why-11</b>	Porteña, Córdoba	May-2010 Jun-2011	Filtración de suero lácteo	Aeróbico	Mezclador hiperboloide sumergido con micro-burbujeo de aire a través de anillo <i>sparger</i>	Ecuilización	45.000 (PE)
<b>SwgA-08</b> <b>SwgA-09</b> <b>SwgA-13</b>	AMBA	Nov-2008 Mar-2009 Abr-2013	Municipal	Aeróbico	Aireación por difusores	Ausente	3.500
<b>SwgB-12</b> <b>SwgB-13</b>	AMBA	Oct-2012 Ago-2013	Municipal	Aeróbico	Aireación por difusores	Sedimentación	270.000
Pha-5.11 Pha-7.11	AMBA	May-2011 Jul-2011	Farmacéutica	Aeróbico	Aireación por difusores	Ecuilización	350 (PE)
PF1-08	AMBA	Sep-2008	Alimento para mascotas	Aeróbico	Aireación por difusores	Flotación por aire disuelto (DAF)	1.875 (PE)
PF2-11	AMBA	Jul-2011	Alimento para mascotas	Aeróbico secuencial	Mezclador/aireador sumergido	Flotación por aire disuelto (DAF)	9.100 (PE)

AMBA: Área Metropolitana de Buenos Aires. PE: Población Equivalente.

### **Muestreo y almacenamiento**

Las muestras fueron tomadas de las cámaras de aireación de las PTEs en pleno funcionamiento. Una vez que se tomaron las muestras, las mismas fueron colocadas en contenedores plásticos y luego transportadas al laboratorio dentro de las 2 horas, a temperatura ambiente y con una amplia cámara de aire para evitar condiciones de anaerobiosis. Una vez en el laboratorio, las mismas fueron almacenadas a -20 °C. Las muestras de lodos activados que trataban el efluente de la filtración de suero fueron la excepción, ya que sus instalaciones se encuentran a 6 horas del laboratorio, y por lo tanto debieron ser congeladas en origen y transportadas con refrigeración.

### **Diseño experimental**

Contar con réplicas de las PTEs a escala real es prácticamente imposible. Como el interés del trabajo radicaba en obtener un conjunto de datos metagenómicos descriptivo para cada sistema, y no en la interpretación detallada de un único instante, se utilizó una estrategia alternativa a las verdaderas réplicas biológicas para la evaluación de la variabilidad dentro de cada sistema de tratamiento (muestras de una misma planta tomadas en tiempos diferentes).

El análisis por pirosecuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S incluyó seis PTEs muestreadas en dos oportunidades y dos PTEs muestreadas en un solo tiempo. Esto suma un total de ocho PTEs, de las cuales siete recibían efluentes industriales y tan solo una trataba efluentes domiciliarios (Tabla 2). El conjunto de datos se amplió con PTEs municipales de China (3), Singapur (1) y Corea del Sur (1), que habían sido analizadas por otros laboratorios y cuyas lecturas de pirosecuenciación habían sido puestas a disposición en el repositorio SRA de NCBI. En particular, se incluyeron: una planta de Corea del Sur de configuración anaeróbica / anóxica / óxica (A/A/O) a escala piloto que trataba efluente domiciliario (Swg-A-KR) (B.-C. Kim et al., 2013), una planta a escala real de configuración A/A/O en Guangzhou, China (Swg-B-CN), una planta CAS + MBR a escala real en Singapur (Swg-B-SG) (Zhang et al., 2012), y dos plantas A/A/O a escala real en Wuxi, China (Swg-C-CN1 y 2) (Wang et al., 2012).

**Tabla 2:** Distribución de las muestras en los diferentes ensayos. El caso excepcional es 'SwgA', cuya muestra del 2009 fue analizada por pirosecuenciación, y la del 2013 por secuenciación al azar.

Rótulos	Pirosecuenciación de amplicones 16S	Secuenciación al azar	Réplicas técnicas p/ secuenciación al azar	Ensamblado de lecturas	Elementos Genéticos Móviles
PtcA-09	Si	Si	Si	Si	Si
PtcA-11	Si	Si	Si	Si	Si
PtcB-08	Si	Si	Si	Si	Si
PtcB-09	Si	Si	Si	Si	Si
Txt-08	Si	Si	Si	Si	Si
Txt-11	Si	Si	Si	Si	Si
Why-10	Si	Si	Si	Si	Si
Why-11	Si	Si	Si	Si	Si
SwgA-08	Si	Si	Si	Si	Si
SwgA-09	Si	-	-	-	-
SwgA-13	-	Si	Si	Si	Si
SwgB-12	-	Si	Si	Si	Si
SwgB-13	-	Si	Si	Si	Si
Pha-5.11	Si	-	-	-	-
Pha-7.11	Si	-	-	-	-
PF1-08	Si	-	-	-	-
PF2-11	Si	-	-	-	-
Otros laboratorios					
Swg-A-KR	Si	-	-	-	-
Swg-B-CN	Si	-	-	-	-
Swg-B-SG	Si	-	-	-	-
Swg-C-CN1	Si	-	-	-	-
Swg-C-CN2	Si	-	-	-	-
PtcC-13	-	Si	-	-	-
PtcC-14	-	Si	-	-	-
PtcD-13	-	Si	-	-	-
PtcD-14	-	Si	-	-	-
SwgC	-	Si	-	-	-
SwgD	-	Si	-	-	-
SwgE	-	Si	-	-	-
SwgF	-	Si	-	-	-

Para la secuenciación al azar se seleccionaron cinco de las ocho plantas de tratamiento analizadas por pirosecuenciación, a las que se agregó una sexta: la planta municipal de mayor tamaño (SwgB). Cada PTE fue representada por dos muestras tomadas a diferentes tiempos. En el caso de la pequeña planta municipal del primer análisis (SwgA), la muestra del año 2009 fue reemplazada por una nueva muestra tomada en 2013 por falta de material. Por otro lado, Las plantas asociadas a la producción de

alimento para mascotas fueron excluidas por consistir en muestras únicas en el tiempo, mientras que las muestras de la planta del efluente farmacéutico lo fueron por estar muy próximas en el tiempo. Para contemplar la variabilidad en el muestreo y en la secuenciación, cada muestra fue dividida en dos réplicas técnicas, sumando así un total de 24 muestras (6 PTEs, 2 tiempos, 2 réplicas técnicas). Además, se incorporaron muestras metagenómicas de PTEs analizadas por laboratorios de otros países. Por un lado, dos muestras de un complejo petroquímico de India Occidental (PtcC y PtcD), con dos muestras en el tiempo cada una (Yadav et al., 2015), y por el otro, 4 muestras únicas de PTEs municipales localizadas en la República Popular China, tres disponibles en el repositorio SRA del NCBI y otra publicada (Ye et al., 2012) (SwgC, SwgD, SwgE, SwgF, respectivamente). Las mismas fueron incluidas en el análisis general. En total, el conjunto de datos consistió en 32 muestras metagenómicas.

### **Determinaciones químicas en efluentes crudos**

Muestras compensadas de efluente de ingreso fueron tomadas solo en cinco de las seis plantas de tratamiento que fueron analizadas por secuenciación al azar, en tiempos posteriores al muestreo original. Las muestras fueron refrigeradas en el momento y transportadas al laboratorio dentro de las dos horas posteriores. En el caso de la planta municipal de mayor tamaño, las muestras corresponden al líquido de salida del sedimentador primario. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Bradford, en triplicado técnico. El método de antrona fue utilizado para determinar los hidratos de carbono totales (Yemm y Willis, 1954). Por último, para la medición de los ácidos grasos volátiles (VFA, del inglés, *volatile fatty acids*) se siguió un protocolo puesto a punto en el laboratorio, que consiste en acidificar por titulación  $V=100$  ml de muestra filtrada con una solución estándar de ácido clorhídrico 0,1N hasta alcanzar  $\text{pH}=3$ , la eliminación del dióxido de carbono por hervor con columna de refrigeración (Liebig), y una nueva titulación con hidróxido de sodio 0,1N hasta  $\text{pH}=6,5$ . Los volúmenes de ácido (A) y base (B) utilizados permiten el cálculo de los ácidos grasos volátiles expresados como miliequivalentes por litro (o equivalentes por  $\text{m}^3$ ) de la siguiente forma:

$$VFA = \frac{(B \times 101) - (A + 100)}{99,23 \times V} \times 100$$

## 2. PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S

### **Extracción de ADN**

Se resuspendió el sólido derivado de 1 ml de lodos activados en 500 µl de solución reguladora TE (pH 8,0), y se lo transfirió a tubos con tapa a rosca de 2 ml que contenían 0,5 g de perlas de sílica de circonio (BioSpec Products, OK). Se agregó 50 µl de SDS 10%, junto con 250 µl de fenol equilibrado en pH 8,0 y 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se realizó una lisis mecánica por agitación en un homogenizador de células (Precellys 24, Bioamerica), en 3 ciclos de 30 segundos a 5000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y tratada con 10 µl de ARNasa A (Invitrogen) por 2 h a 37 °C. A continuación se realizaron dos extracciones con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados en dos volúmenes de etanol 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio, y lavados dos veces con etanol 70%. Finalmente, el material centrifugado fue resuspendido en 50 µl de agua libre de ADNasas.

### **PCR-DGGE**

A modo de análisis preliminar, y con el objetivo de verificar la capacidad de amplificación sobre las muestras de ADN metagenómico, así como de obtener una visualización general de la riqueza y la equitatividad, descartando eventualmente aquellas sesgadas por un único taxón dominante, las comunidades bacterianas de las PTEs fueron evaluadas mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, del inglés, *denaturing gradient gel electrophoresis*) para el gen de ARNr 16S. Se analizó un número mayor de muestras de las que luego fueron secuenciadas. Muchas de ellas fueron descartadas por carecer de datos respecto a variables de operación, y para contar con un diseño experimental balanceado. Se amplificó el segmento delimitado por los cebadores universales 341GCf y Eub518r, en una mezcla de PCR que consistió en cebadores (0,1 mM), ADN metagenómico molde (20 ng), buffer de reacción (1X), desoxirribonucleótidos trifosfato (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) y polimerasa

de ADN *Taq* (1 U, Life Technologies Corporation) en 50  $\mu$ l finales, con el siguiente programa de amplificación: 5 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 45 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de amplificación fue concentrado hasta los 10  $\mu$ l en *SpeedVac* (FTS Systems) para poder ser sembrado posteriormente en el gel.

La técnica de DGGE fue realizada tal como lo describe Muyzer y colaboradores (Muyzer et al., 1993), en un gel de poliacrilamida 8% con gradiente de urea-formamida 40-65% (100% desnaturalizante: urea 7M y formamida 40%). El sistema de DGGE (CBS Scientific, DelMar, CA, EEUU) fue utilizado según las indicaciones del fabricante. Luego de una electroforesis de 16 h a 60 V, los geles de poliacrilamida fueron teñidos durante 30 min en una solución de SYBR Gold (Invitrogen), dilución 1:10000 en TAE (ph 8,0), y lavados en solución TAE fresca por otros 10 min. A continuación, los geles fueron fotografiados inmediatamente en un transiluminador UV combinado con una cámara y un sistema de adquisición de imágenes (Syngene). En este tipo de geles, cada banda observada es considerada como un taxón, y su intensidad representa un valor estimado de su abundancia<sup>1</sup>. En una primera instancia, las imágenes fueron analizadas cualitativamente con el objetivo de verificar la amplificación de un número significativo de secuencias diversas y de comparar, con baja rigurosidad y a modo exploratorio, los perfiles de bandas observados en las diferentes muestras. Por medio del programa *GelCompar* (Applied Maths) se obtuvo la matriz de intensidad correspondiente a cada gel. Esto permitió la contabilización de las bandas por muestra, con el objetivo de comparar la riqueza de las especies dominantes, y el cálculo del índice de diversidad de Shannon, el cual considera la presencia de una especie (aquí representada por una banda de ADN en el gel) y su abundancia (representada por la intensidad de la banda), otorgándole valores mayores a comunidades numerosas en especies pero al mismo tiempo equitativas, es decir, sin el dominio de unas pocas. Los índices se calcularon sobre la matriz de intensidad de bandas con el programa PaSt 2.17 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

---

<sup>1</sup> Para entender los alcances y las limitaciones de la técnica, referirse a Forney et al, 2004

### **PCR y secuenciación de amplicones**

Se utilizaron los cebadores universales para bacterias F27 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y R518 (5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3') para amplificar por triplicado las regiones variables V1 a V3 del gen 16S ARNr. La mezcla de reacción de PCR consistió en cebadores etiquetados (0,3 mM), ADN metagenómico molde (15 ng), buffer de reacción (2X), desoxirribonucleótidos trifosfato (0,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (1mM) y ADN polimerasa Platinum Pfx (1U, Life Technologies Corporation) en 50 µl finales. Las etiquetas de 10 pb, ubicadas en el extremo 5' de los cebadores, permitieron asociar productos individuales de PCR con cada muestra. El programa de amplificación constó de: 2 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 30 s a 68 °C, y una extensión final de 10 min a 68 °C. Los amplicones obtenidos fueron purificados en gel de agarosa 1%, extraídos con el kit AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences), y cuantificados por medio de espectroscopía UV-visible (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Con todos ellos se preparó una mezcla equimolar que fue enviada a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para la construcción de la biblioteca de amplicones, la PCR en emulsión y la pirosecuenciación Roche 454 GS-FLX. Las lecturas originales fueron depositadas en la base de datos SRA del NCBI bajo el código de acceso SRA061963.

### **Análisis de datos de pirosecuenciación de amplicones**

Se utilizó el programa 'mothur' (versión 1.22.2) para el procesamiento de los datos de secuenciación (Schloss et al., 2009), utilizando como guía el Procedimiento Operativo Estandarizado (SOP) sugerido por el autor. Se trata de un programa de uso libre y código abierto, que agrupa numerosas funciones ejecutables por línea de comando, destinadas a la manipulación de archivos primarios, su procesamiento completo y múltiples herramientas de análisis estadístico. El trabajo sobre las secuencias propiamente dichas fue llevado a cabo localmente en un servidor de 16 núcleos y 32 GB de memoria RAM, lo que permitió aprovechar la posibilidad que ofrece el programa 'mothur' de dividir tareas intensas en múltiples procesadores. Salvo que se indique, se utilizaron los parámetros predeterminadas de cada comando.



La pirosecuenciación 454 (Roche) se caracteriza por la generación de secuencias largas, en términos relativos (500-1000 pb). Entre sus artefactos característicos se encuentran la generación de homopolímeros nucleotídicos y de inserciones y deleciones (*in-del*) respecto del molde original. Por otra parte, el flujo secuencial de los cuatro nucleótidos trifosfatados del ADN durante la corrida de pirosecuenciación está asociado a un posterior ruido o error en las lecturas, propios de la tecnología Roche 454. Los archivos primarios son archivos de flujo, que contienen las secuencias representadas por los registros individuales de intensidad por nucleótido incorporado. Como el flujo tiene un orden de nucleótidos conocido, y los archivos primarios incluyen medidas de calidad de registro, a partir de los mismos es que se realiza la transformación a archivos de formato FASTQ, o FASTA y QUAL.

El programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) permite extraer información básica sobre la calidad de la corrida a partir de archivos FASTQ, reportando medidas de resumen y gráficos descriptivos del conjunto de secuencias, relacionados con el largo de secuencia y la calidad de registro medido en valor Phred. Tras la revisión de dichos parámetros, se estableció que el desempeño del ensayo ejecutado había sido satisfactorio y coincidía con lo esperado para esta tecnología (ver Apéndice: Fig. A5, A6, A7).

El primer paso del procesamiento de los datos consistió en una remoción de lecturas que no cumplieran con los siguientes requisitos de calidad: 450 flujos detectados como mínimo, sin posiciones ambiguas (N), un máximo de 2 pb de discrepancia con la secuencia del cebador, y un máximo de 1 pb de discrepancia con la secuencia de la etiqueta. Además, se limitó el número máximo de flujos también a 450 pb. Posteriormente se aplicó la implementación de PyroNoise en 'mothur' para liberar a los registros del ruido característico. Al término del proceso, los archivos fueron convertidos automáticamente al formato FASTA, sobre los cuales se hizo una segunda remoción de secuencias de baja calidad con los parámetros de discrepancias ya mencionados junto a los siguientes: 8 pb como largo máximo de un homopolímero, y 200 pb como largo mínimo de secuencia. Los cebadores y las etiquetas fueron removidos en forma definitiva.

A continuación se procedió a alinear las secuencias contra la base de datos SILVA v102, una base de datos de genes ARNr 16S curada. El alineamiento finalizado permitió

mejorar la detección de secuencias espurias. Por un lado, fue posible detectar a las que se encontraban fuera del espacio de alineamiento principal y descartarlas, porque eran candidatas a ser contaminaciones, es decir, externas al amplicón seleccionado. Por el otro lado, por medio del algoritmo *uchime* (Edgar et al., 2011) implementado en el programa 'mothur', se identificaron las potenciales secuencias quiméricas que se originan en el proceso de amplificación por PCR (Wang y Wang, 1997; Haas et al., 2011). Como último paso del procesamiento básico, se redujo una vez más el error de secuenciación por medio de la vinculación de secuencias poco abundantes con secuencias altamente similares pero abundantes por medio del comando *pre.cluster* (discrepancia de 2 pb).

En este punto se optó por dos tratamientos diferentes, cuyo objetivo era análogo: distribuir las secuencias en grupos que representarían a los diferentes taxones bacterianos. En la vía independiente de taxonomía, se agruparon las secuencias según un umbral de similitud (95 y 97%), a través del agrupamiento de enlace promedio. Es decir, todas aquellas lecturas que eran similares en un 95 o 97% de secuencia, conformaban una Unidad Taxonómica Operacional (OTU, del inglés, *Operational Taxonomic Unit*). Se considera que la similitud del 97% es una aproximación al nivel taxonómico de especie, mientras que un 95% de similitud corresponde a nivel de género. Para esta vía es condición necesaria que las secuencias estén alineadas. En este trabajo, las discrepancias por largo y por omisión de nucleótidos (*gaps*) fueron tratadas con los parámetros propuestos por el autor del programa. En cuanto a la vía dependiente de taxonomía, en ella se asignaron las secuencias a determinados taxones por medio de una comparación con una base de datos de ARNr 16S. La ventaja de esta vía es que permite analizar conjuntos de secuencias no alineadas, que provengan en este caso de regiones hipervariables diferentes. Particularmente, se utilizó Clasificador Bayesiano Ingenuo (Wang et al., 2007) contra la base de datos *Ribosomal Database Project* (RDP; set de entrenamiento 9), con un umbral de confianza mínima del 50%, a modo de compromiso entre mantener una precisión de clasificación relativamente alta y maximizar el número de secuencias clasificables. Con ambas vías se logró obtener una tabla de abundancias, lo que conforma la base de gran parte de los análisis estadísticos posteriores. En este caso, por medio de un submuestreo realizado con la función *sub.sample* del 'mothur', la tabla fue normalizada respecto a un número mínimo de

secuencias por muestra (5000). La página web del programa cuenta con la explicación detallada de cada función (<http://www.mothur.org/wiki>). El Procedimiento Operativo Estándar referido, para datos de pirosecuenciación 454, corresponde al del año 2012.

En ecología, la diversidad alfa describe la diversidad presente en una muestra. Se visualizaron la riqueza y la cobertura por medio de curvas de rarefacción con 1000 iteraciones de muestreo. Con las OTUs definidas al 97% y al 95% de similitud se calcularon los índices de Good, Chao1 y ACE. El índice de Good estima la cobertura obtenida en un muestreo, y toma valores entre 0 y 1, siendo 1 la cobertura máxima. Los índices de Chao1 y ACE son estimadores de la abundancia real a partir de la observada. La comparación de los índices de Shannon y Chao1 entre plantas de tratamiento industriales y municipales se realizó con una prueba t de Student.

Se incluyeron datos publicados de plantas de tratamiento de efluentes municipales de otros tres laboratorios, para compararlos con los datos del presente estudio. Los mismos provenían de una planta a escala real de configuración anaeróbica / anóxica / óxica (A/A/O) en Guangzhou, China (Zhang et al., 2012), una planta CAS + MBR a escala real en Singapur, una planta A/A/O a escala real en Wuxi, China (Wang et al., 2012) y una planta A/A/O a escala piloto que trataba efluente domiciliario en Corea del Sur (B.-C. Kim et al., 2013). Mientras que en el último trabajo se secuenció la misma región hipervariable del gen ARNr 16S que para esta tesis (V1-V3), los primeros dos estudios amplificaron la región V4. Los datos de (Zhang et al., 2012) y (B.-C. Kim et al., 2013) fueron obtenidos de la base de datos SRA del NCBI y procesados con 'mothur' al igual que el resto de las muestras. Por el contrario, los datos del trabajo de Wang y colaboradores (Wang et al., 2012) no estaban disponibles públicamente, por lo que se reconstruyó la información taxonómica completa a partir de las tablas de abundancia a nivel de género. Por ello y por el uso de diferentes zonas hipervariables, las comparaciones de la distribución de taxones entre las muestras fueron hechas utilizando la información de las secuencias clasificadas.

Las tablas de abundancia, a las que se le aplicó una transformación de raíz cuadrada, fueron ingresadas a un análisis de agrupamiento jerárquico en el programa PaSt, utilizando la medida de similitud Bray-Curtis, el algoritmo de agrupamiento de enlace promedio y un índice de confianza sobre 100 iteraciones (*bootstrap*, en inglés).

Los análisis de ordenamiento fueron llevados a cabo con el paquete estadístico 'vegan' 2.0-10 (Departamento de Estadística, Universidad del Estado de Iowa, IA, EEUU) en R 2.15.1, con parámetros por defecto. Los taxones con abundancias menores a 0,5% y las bacterias no clasificadas en algún filo fueron excluidas del análisis. Se optó por una transformación de raíz cuadrada para reducir el efecto de los grupos dominantes.

El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, del inglés, *Principal Coordinates Analysis*) permitió visualizar la distancia entre las muestras. El Análisis Restringido de Coordenadas Principales (abreviado en inglés como CAP), por su parte, permitió visualizar patrones generales de dispersión de las comunidades de las diferentes PTEs y examinar si las comunidades bacterianas se correlacionan con las variables operacionales principales del proceso. El CAP es un ordenamiento restringido similar al análisis de redundancia, que fue ganando atención en ecología de comunidades porque puede ser aplicado a índices de disimilitud no euclidianos, como Jaccard, Bray-Curtis o distancias filogenéticas como UniFrac (Anderson y Willis, 2003). Werner y colaboradores lo utilizaron para explicar las diferencias filogenéticas observadas en bioreactores anaeróbicos en base a un grupo de gradientes ambientales (Werner et al., 2011). En esta tesis se trabajó con la disimilitud Bray-Curtis, una métrica común en ecología de comunidades. Y la ya mencionada discrepancia entre regiones hipervariables seleccionadas por los diferentes laboratorios, impidió que se pueda evaluar variaciones en la estructura de la comunidad entre muestras por medio de distancias filogenéticas como UniFrac (Lozupone y Knight, 2005). A modo complementario se realizó un Análisis de Correspondencia Canónico (abreviado en inglés como CCA) en base a la raíz cuadrada de las abundancias relativas de los filos bacterianos superiores a 1%, con el objetivo de desenmascarar la influencia de grupos taxonómicos minoritarios.

Con el propósito de definir un intervalo de confianza de las muestras municipales analizadas, en el ordenamiento se incluyó una elipse correspondiente a un 95% de confianza. Por último, para evaluar si existía una asociación significativa de las variables del proceso con el patrón de diversidad de las comunidades bacterianas, se llevó a cabo una prueba de hipótesis por permutación de 1000 iteraciones, disponible bajo la función 'anova' en el paquete 'vegan' de R. Las pruebas de permutación, también conocidas como pruebas de aleatorización, se utilizan para confeccionar la distribución

nula de un estadístico de prueba, contra el que se pueda evaluar el valor observado del estadístico. Si este valor observado es poco usual en el contexto de la distribución nula generada por la permutación de los datos, se puede concluir que es poco probable que la asociación observada haya surgido por azar y no sea significativa. En particular para esta tesis, de aquellas muestras que contenían dos muestras de diferentes tiempos, se tomó una única muestra a fin de no violar el supuesto de independencia. Las variables de operación utilizadas fueron la temperatura (T), el pH, el tiempo de retención de sólidos (TRS), los sólidos suspendidos en licor mezcla (MLSS, del inglés, *mixed liquor suspended solids*), y el oxígeno disuelto (OD). Se utilizaron valores estandarizados, con promedio igual a cero (*z-score*).

### 3. SECUENCIACIÓN AL AZAR DE ADN METAGENÓMICO

#### **Extracción de ADN y secuenciación**

Para cada muestra, los sólidos centrifugados de 1ml de lodos activados fueron resuspendidos en solución reguladora de fosfato de sodio del *kit* para suelos FastDNA Spin (MP Biomedicals, Inc.), con el que se extrajo el ADN acorde a las instrucciones del fabricante.

Las muestras de ADN fueron divididas en dos réplicas técnicas y enviadas al INDEAR (Rosario, Argentina) para la preparación de una biblioteca Nextera (rango de fragmentos: 300 – 1000 pb) y los posteriores protocolos de secuenciación Illumina. Se optó por una corrida rápida de extremos pareados (*paired-end* en inglés), de lecturas de 150 pb, en dos calles de Illumina HiSeq 1500, lo que produjo un total de 319 millones de lecturas (47,9 Gpb), con 8.7-16.3 millones de lecturas por muestra (1.30-2.44 Gpb). Los archivos de datos primarios fueron depositados en NCBI-SRA bajo el código de acceso PRJNA288131.

#### **Análisis de datos de secuenciación masiva al azar**

Se realizó una primera exploración de los datos con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que arroja un reporte sobre el número, la calidad y el largo de las secuencias, el contenido de indeterminaciones y de nucleótidos GC, y la sobrerrepresentación de secuencias, entre otras relevantes medidas. Los archivos en formato FASTQ fueron subidos luego al servidor del MG-RAST (del inglés *Metagenome - Rapid Annotation using Subsystem Technology*) y analizados por su procesamiento estándar de filtrado por calidad y posterior anotación, con parámetros por defecto (Meyer et al., 2008). MG-RAST fue especialmente concebido para trabajar con lecturas metagenómicas cortas y no ensambladas, las cuales conservan la información de abundancia original con un impacto de sesgos técnicos relativamente bajo. Los resultados para las lecturas pareadas separadas exhibieron diferencias mínimas. En consecuencia, en esta primera parte sólo se muestran los resultados para las lecturas anteriores (*forward*, R1). En particular, se

removieron las lecturas con frecuencia de aparición  $>1$  (réplicas idénticas artificiales) y las lecturas de baja calidad según un puntaje Phred mínimo de 15 y un máximo de 5 bases con el puntaje Phred mínimo. Un primer perfil de abundancia de organismos fue inferido a partir del alineamiento de las secuencias contra la base de datos de proteínas M5nr (nr: no redundante) (Wilke et al., 2012). Se exigió un alineamiento mínimo de 15 nucleótidos, con un valor  $E < 1e-05$  y al menos un 60% de identidad. El contenido de GC por secuencia fue calculado con la función 'infoseq' (<http://emboss.open-bio.org/>) sobre las lecturas de alta calidad, cuyo resultado fue distribuido luego en intervalos de rango 2% por la función 'hist' en R (3.0.2). A partir de la asignación taxonómica, también se calculó el contenido de GC por lectura para cada uno de los once filos más representados, cuya distribución a lo largo de las muestras fue comparada con la distribución promedio del resto de las lecturas, a través de una correlación de Spearman (correlación por rangos).

El potencial fenotípico fue analizada en base los subsistemas de la estructura jerárquica SEED (Overbeek et al., 2005), en particular el nivel 1 (funciones metabólicas generales) y el nivel 3 (camino metabólicos y funciones celulares específicas). La riqueza funcional fue computada en base a las muestras normalizadas como el número de subsistemas representados a nivel 3. A lo largo de las 32 muestras, se contabilizaron 1127 categorías funcionales.

MG-RAST ofrece la identificación particular de lecturas que correspondan a genes de ARN ribosomal. Se seleccionaron las anotaciones de un largo mayor a 100 pb, y se las clasificó contra la base de datos RDP, set de entrenamiento 9, con un umbral de confianza mínima del 50%, utilizando nuevamente el programa 'mothur' v.1.33.3. El procesamiento del MG-RAST identificó  $1,1-6,9 \times 10^5$  lecturas como probables fragmentos de ARNr (70% identidad), de los cuales  $2,3-21,5 \times 10^3$  pasaron el filtro de longitud. En base la información del ARNr 16S aquí detectado, se estimó la riqueza taxonómica como el número de géneros bacterianos según las muestras normalizadas (810 géneros a lo largo de las 32 muestras).

Las diferencias en la diversidad taxonómica y funcional entre comunidades de lodos activados municipales e industriales fueron verificadas por medio de un prueba t de Student. El Análisis de Componentes Principales (PCA), el de Coordenadas Principales (PCoA), y el de Correspondencia (CA) fueron realizados en R con el paquete 'vegan'

2.0-10. El PCA y el CA fueron hechos en base a los subsistemas SEED a nivel 3. Sus correspondientes cargas de ordenamiento fueron ordenadas según los ejes de mayor contribución (PCA1 y CA1, respectivamente), para identificar luego las 20 funciones de mayor influencia en el ordenamiento (las 10 de mayor y las 10 de menor carga). Lo que se reportó, finalmente, fueron los valores relativos de carga junto con la proporción de varianza explicada por cada eje principal.

Para evaluar la asociación de parámetros de operación con las estructuras funcionales de las comunidades de lodos activados, se realizó una prueba de ajuste de las variables sobre el PCA de subsistemas nivel 1. El análisis se llevó a cabo por medio de la función 'envfit' del paquete 'vegan' en el entorno R, en base a 1000 permutaciones. Las muestras tomadas en diferentes tiempos fueron fijadas dentro del parámetro 'strata'. Se utilizó el mismo conjunto de variables ambientales que en la primera parte del trabajo: temperatura (T), pH, tiempo de retención de sólidos (TRS), sólidos suspendidos en licor mezcla (SS), y oxígeno disuelto (OD). Los valores fueron estandarizados previo a su utilización, para que su promedio sea igual a cero y el desvío estándar igual a uno (*z-score*). Las muestras secuenciadas por otros laboratorios no fueron incluidas en este análisis debido a la escasez de datos de operación.

La comparación de categorías funcionales entre muestras metagenómicas de PTEs municipales y de aquellas relacionadas a la industria petroquímica fue llevada a cabo en el programa de uso libre STAMP v.2.0.9 (STAMP, abreviado del inglés *Statistical Analysis of Metagenomic Profile*) (Parks et al., 2014) por medio de un prueba t de Student de dos colas. Aquí, las réplicas técnicas y las muestras tomadas a tiempos diferentes fueron promediadas en una única muestra. Fue aplicado el método Benjamini-Hochberg FDR (abreviado del inglés *False Discovery Rate*) de corrección del p-valor para minimizar la detección de falsos positivos.

### **Ensamblado de lecturas metagenómicas**

En este caso se utilizaron los datos correspondientes a lecturas anteriores (*forward*) y posteriores (*reverse*) de tipo *paired-end*. Las lecturas primarias provenientes de réplicas técnicas fueron unificadas en un único archivo según fueran anteriores o posteriores. Se descartaron aquellas de baja calidad por medio del programa Trimmomatic v0.35



(Bolger et al., 2014) con los parámetros sugeridos para remover posiciones de baja calidad o indeterminaciones (N) de conjuntos de lecturas pareadas (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>). Para el ensamblado de las lecturas, se construyeron grafos de *de Bruijn* por medio del programa Velvet v1.2.10 (Zerbino y Birney, 2008), los cuales luego fueron descompuestos por el programa MetaVelvet v1.2.01 (Namiki et al., 2012), con picos de cobertura de *k*-meros fijados manualmente. El largo del inserto (región ubicada entre 2 lecturas pareadas) se fijó en 350 pb, y los *contigs* (secuencias ensambladas) de tamaño menor a 1 kpb fueron excluidos. El largo óptimo de *k*-mero se obtuvo por la prueba de seis largos de *k*-meros de entre 51 y 101 pb, cuyos resultados fueron evaluados en cuanto a cuatro parámetros básicos: tamaño total (pb), número de *scaffolds*, largo máximo de *scaffold*, y N50.

Las muestras metagenómicas ensambladas fueron procesadas por el MG-RAST en su modalidad especial para secuencias ensambladas. La salida y la disponibilidad de datos analizados en MG-RAST es prácticamente idéntica a la que se obtiene con lecturas no ensambladas. De aquí se obtuvo la información de subsistemas jerárquicos SEED, así como la información taxonómica según la base de datos RefSeq.

#### 4. ANÁLISIS DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

##### Ensayos de PCR cuantitativa

Con el propósito de estudiar los patrones de abundancia de EGMs en las diferentes plantas de tratamiento de efluentes, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en base a seis genes asociados o bien a integrones de clase 1 y 2, o bien a plásmidos del grupo de incompatibilidad P. Los primeros ensayos estuvieron dirigidos a la detección del integrón de clase 1 a través de los genes de la integrasa (*intI1*), y de la resistencia a la sulfonamida (*sulI*) y la resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (*qacE-qacEA1*), aunque estos últimos pueden estar presentes también en el genoma. En otro ensayo, los integrones de clase 2, menos abundantes y con arreglos de *cassettes* más conservados, fueron cuantificados por medio de una PCR cuantitativa dirigida a su integrasa (*intI2*), la cual es inactiva. En cuanto a los plásmidos de amplio rango de hospederos IncP-1, la mayor parte de sus miembros fueron censados a través de una PCR cuantitativa dirigida al gen *korB*, mientras que el subgrupo IncP-1ε fue detectado a través del gen *trfA*, que codifica para la proteína de inicio de la replicación. En cada caso se utilizaron un par de cebadores en combinación con una sonda marcada con un fluoróforo (Tabla 3), en mezclas de reacción detalladas en las tabla 4 y 5, y con programas de amplificación y detección detallados en la tabla 6. Se calculó el promedio y el desvío estándar a partir de tres determinaciones. Los valores finales se expresaron relativos al número de moléculas del gen de ARNr 16S, en escala logarítmica. Para el conjunto de ensayos de PCR cuantitativa, el rango de eficiencia fue de 96,2-108,1%, mientras que los coeficientes de correlación de la curva estándar oscilaron entre 0,997 y 1,000.

##### Cassettes génicos en integrones

Como metodología adicional, se analizó de forma cualitativa la presencia de *cassettes* génicos contenidos en integrones de clase 1. La estrategia consistió en realizar una amplificación de la región de inserción por PCR a partir de las regiones conservadas que la flanquean (5' y 3'). Para ello se utilizaron los cebadores directo 5'-

GGCATCCAAGCAGCAAGC-3' y reverso 5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3' (Sandvang et al., 1997), en una mezcla de reacción que incluyó solución reguladora (1X), desoxirribonucleótidos trifosfato (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), BSA (0,1 mg/ml), cebadores (0,2 μM), polimerasa de ADN *Taq* (0,625 U, Fermentas) y ADN molde (1 μl) en un volumen final de 25 μl. El programa de amplificación consistió en 5 min a 95 °C, y luego 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 55 °C por 40 s y 72 °C por 4 min, finalizando con 10 minutos de elongación a 72 °C. El producto de PCR fue luego analizado por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Vale aclarar que esta estrategia está limitada a la detección de arreglos de *cassettes* génicos relativamente pequeños, y que originalmente fue diseñada para muestras clínicas, por lo que su resultado en muestras ambientales de mayor diversidad no es necesariamente el óptimo.

**Tabla 3:** Lista de cebadores y sondas TaqMan utilizados en PCR cuantitativas. Los oligonucleótidos se presentan en dirección 5'-3'. En la parte inferior de la tabla se aclaran las siglas de los fluoróforos.

	Cebador directo	Cebador reverso	Sonda TaqMan	Referencia
<i>16S rDNA</i>	CGGTGAATACGTTTCYCGG	GGWTACCTTGTTACGACTT	FAM- CTGTACACACCCGCCGT C-TAMRA	(Suzuki et al., 2000)
<i>int1</i>	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	GATCGGTGCAATGCGTGT	FAM- ATTCTGGCCGTGGTTCTG GGTTTT-BHQ1	(Barraud et al., 2010)
<i>sul1</i>	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	TTGCCGATCGCGTGAAGT	FAM- CAGCGAGCCTTGCGGCCG -TAMRA	(Heuer y Smalla, 2007)
<i>qacE + qacEΔ1</i>	CGCATTTTATTTCTTCTCTGGTT	CCCGACCAGACTGCATAAGC	FAM- TGAAATCCATCCCTGTCTG GTGT-TAMRA	(Jechalke, Schreiter, et al., 2013)
<i>int2</i>	TGCTTTCCACCCCTTACC	GACGGCTACCTCTGTTATCTC	TexasRed- TGGATACTCGCAACCAAG TTATTTTACGCTG-BHQ2	(Barraud et al., 2010)
<i>trfA</i>	ACGAAGAAATGGTTGCTCTGTTC	CGTCAGCTTGCGGTACTTCTC	FAM- CCGGCGACCATTACAGCA AGTTCATT-TAMRA	(Heuer et al., 2012)
<i>KorB1 + pKS208</i>	TCATCGACAACGACTACAACG + TCGTGGATAACGACTACAACG	TTCTTCTGCCCTTCGCCAG + TTYTTCYTGCCCTTGCCAG + TTCTTGACTCCCTTCGCCAG	FAM- TCAGYTCRTTGCGYTGCA GGTTCTCVAT-TAMRA + FAM- TSAGGTCGTTGCGTTGCA GGTTYTCAAT-TAMRA	(Jechalke, Dealtry, et al., 2013)

FAM: *Fluorescein amidite*; BHQ: *Black Hole Quencher*; TAMRA: *Tetramethylrhodamine azide*.

**Tabla 4:** Mezclas de reacción para las PCR cuantitativas, volumen final de 50 µl.

	<i>16S rDNA</i>	<i>intI1</i>	<i>sulI</i>	<i>qacE + qacEΔI</i>	<i>intI2</i>	<i>trfA<sup>1</sup></i>
H <sub>2</sub> O	12,75	22,75	22,75	22,75	22,75	22,25
10x buffer	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
2mM dNTPs	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
25mM MgCl <sub>2</sub>	6,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
2mg/ml BSA	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-
Cebador Fwd	6,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cebador Rev	5,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sonda TaqMan	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Taq Pol (Fermentas)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

1: Detección específica de plásmidos IncP-1e

**Tabla 5:** Mezcla de reacción para la PCR cuantitativa de *korB*, volumen final de 50 µl.

	<i>korB + pKS208</i>
H <sub>2</sub> O	15,25
10x buffer	5,0
2mM dNTPs	5,0
25mM MgCl <sub>2</sub>	7,0
2mg/ml BSA	2,5
KorB-F	2,0
KorB-Fz	1,0
KorB-R	2,0
KorB-Rge	1,0
KorB-Rd	1,0
Sonda TaqMan 1	1,5
Sonda TaqMan 2	1,5
Taq Pol (Fermentas)	0,25

**Tabla 6:** Programas de amplificación para los ensayos de PCR cuantitativa

	<i>16S rDNA</i>	<i>intI1</i>	<i>sulI</i>	<i>qacE + qacEΔI</i>	<i>intI2</i>	<i>trfA</i>	<i>korB + pKS208</i>
	5 min 95 °C	10 min 95 °C	5 min 95 °C	10 min 95 °C	10 min 95 °C	10 min 95 °C	5 min 95 °C
40x	15 s 95 °C	30 s 95 °C	15 s 95 °C	30 s 95 °C	30 s 95 °C	15 s 95 °C	15 s 95 °C
	15 s 56 °C						15 s 54 °C
	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]	1 min 60 °C [Detección]

# Resultados

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES

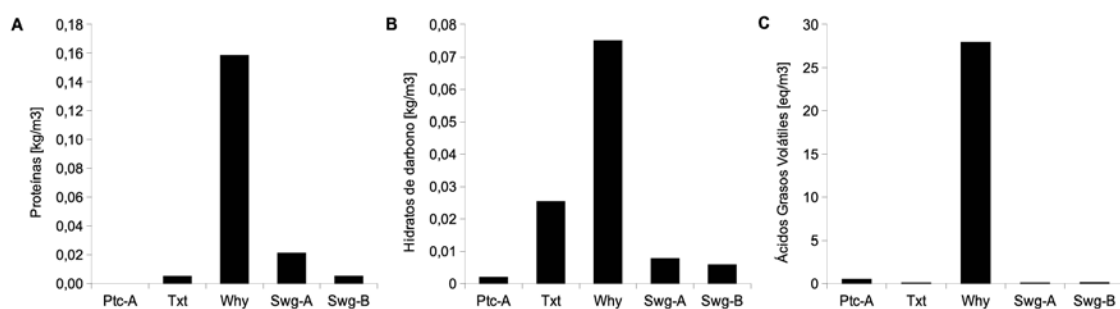
Los valores de los parámetros operacionales de cada PTE fueron gentilmente cedidos por el personal encargado de la operación de cada uno de los sistemas. Para cada muestra se promediaron los datos correspondientes al mes previo al muestreo. Ciertas PTEs presentan parámetros que las diferencian del resto. Tal es el caso de la PTE de la tintorería textil, en la que el pH del efluente de ingreso es ligeramente alcalino, acompañado de una alta conductividad. El efluente de la ultrafiltración de suero lácteo, por su parte, ingresa al tratamiento con una elevada carga orgánica y también con una alta concentración de sales. La planta que trata el efluente de polímeros acrílicos trabaja a muy altos valores de oxígeno disuelto, mientras que la refinería de petróleo genera el efluente de mayor temperatura, además de contar con un considerable tiempo de retención celular en su planta de tratamiento. Al momento del muestreo, todas ellas se encontraban en normales condiciones de funcionamiento, habiendo estado en actividad durante más de 10 años.

Para muestras compensadas de los efluentes de ingreso de cinco de las seis plantas de tratamiento localizadas en Argentina, se llevaron a cabo ensayos químicos para determinar las concentraciones de proteínas, hidratos de carbono y ácidos grasos volátiles. En los tres casos, el efluente derivado del proceso de filtración de suero lácteo superó al resto de las muestras. La determinación de hidratos de carbono totales presentó un valor intermedio para el efluente de la tintorería textil, y valores más bajos para el resto, aunque con mayores concentraciones en las cloacales que en la refinería de petróleo (Fig. 4B). Esta última no presentó valores detectables de proteínas (Fig. 4A), que sí fueron detectadas en el efluente textil y en los cloacales, siendo el contenido proteico levemente superiores en la planta de menor tamaño (SWGa). Los ácidos grasos volátiles permanecieron prácticamente bajo el límite de detección en la mayoría de las muestras, salvo en aquella vinculada al procesamiento de suero lácteo (Fig. 4C).

**Tabla 7:** Características y parámetros de proceso para las PTEs de Argentina. Los rangos y promedios corresponden a los valores medidos a lo largo de un mes previo al muestreo.

Efluente	Rótulo	VCA <sup>1</sup> (m <sup>3</sup> )	SS <sup>2</sup> (mg/L)	TRS <sup>3</sup> (d)	TCO <sup>5</sup> (kg BOD/m <sup>3</sup> )	pH	OD <sup>4</sup> (mg/L)	Temperatura (°C)	DQO
Tintorería textil	Txt-08	3500	3594	68	0,33-0,37	8,0-8,8	0,5-0,7	26-33	685-922
	Txt-11		6563	40	0,29-0,38	8,0-8,9	0,4-0,6	26-30	515-593
Refinería de petróleo	Ptca-09	5430	4850	86	0,44-0,52	7,1-7,6	1,4-2,1	32-37	516-837
	Ptca-11		4425	69	0,45-0,51	7,1-7,7	1,8-2,3	33-37	674-901
Polímeros acrílicos	Ptcb-08	200	4350	70	0,07-0,09	7,0-7,4	8,1-8,9	24-27	439-920
	Ptcb-09		3313	53	0,06-0,07	7,0-7,5	8,0-8,7	22-26	475-526
Farmacéutica	Pha-5.11	40	2788	16	0,42-0,48	6,8-7,0	3,2-5,1	20-21	450-710
	Pha-7.11		3113	15	0,46-0,51	6,9-7,2	1,6-5,9	20-22	430-720
Municipal	SwgA-08	200	4469	18	0,41-0,44	7,1-7,4	3,4-4,1	17-21	463-738
	SwgA-09		5038	23	0,38-0,44	7,1-7,5	2,9-3,6	18-23	341-637
	SwgA-13		5002	23	0,40-0,45	7,0-7,5	3,1-3,8	17-22	142-546
Municipal	SwgB-12	13400	2110	7	1,37-1,57	7,0-7,5	3,0-3,5	18-23	191-265
	SwgB-13		2445	7	1,59-1,62	7,0-7,6	3,2-3,5	16-20	212-284
Procesamiento de suero lácteo	Why-10	5000	8163	28	0,60-0,65	7,2-7,7	0,9-1,2	24-28	3545-5030
	Why-11		6531	33	0,63-0,66	7,2-7,8	0,7-1,0	22-28	2598-3883
Alimento para mascotas 1	PF1-08	125	3875	32	0,85-0,99	6,7-7,1	1,8-4,6	20-22	1810-2090
Alimento para mascotas 2	PF2-11	160	8125	5	0,90-3,41	6,9-7,5	0,8-1,3	19-22	2850-3685

<sup>1</sup>VCA: volumen cámara aireación; <sup>2</sup>SS: sólidos en suspensión; <sup>3</sup>TRS: tiempo de retención de sólidos. <sup>4</sup>TCO: tasa de carga orgánica. <sup>5</sup>OD: oxígeno disuelto. DQO: Demanda Química de Oxígeno.

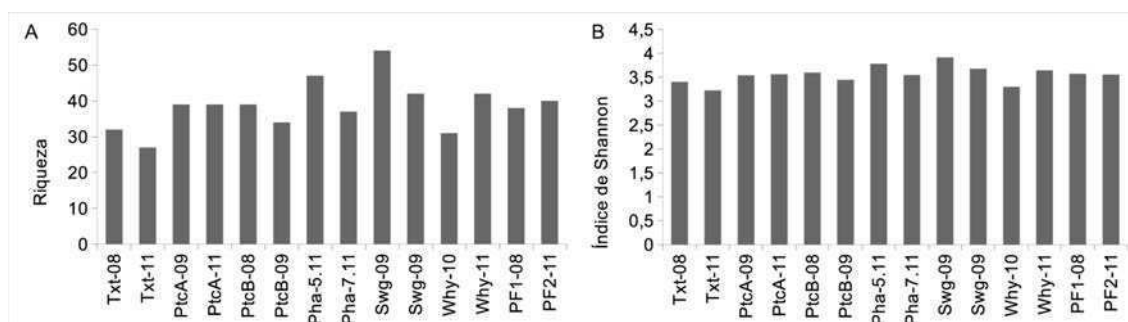


**Figura 4:** Concentración de (A) proteínas, (B) hidratos de carbono y (C) ácidos grasos volátiles, en muestras compensadas de efluentes de ingreso crudos. No se indican los años en los rótulos de las muestras, ya que las mismas no coinciden en fecha con el muestreo original.

## 2. PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S

### Evaluación preliminar de la diversidad por PCR-DGGE

A modo de análisis exploratorio previo a la pirosecuenciación, las comunidades bacterianas de lodos activados fueron sometidas al análisis de sus perfiles moleculares en base al gen de ARNr 16S. La amplificación del fragmento 341-534 (posición en *E. coli*) fue exitosa en todas las muestras de ADN metagenómico. El análisis en geles de poliacrilamida conteniendo gradientes desnaturalizantes (DGGE) permitió contemplar los múltiples escenarios que pueden darse en sistemas biológicos de tratamiento de efluentes, en los que la riqueza y la equitatividad de la comunidad bacteriana pueden variar notoriamente. En este censo inicial fue posible observar que las muestras provenientes de una misma planta de tratamiento, aún con meses o años de diferencia, compartían un importante número de posiciones de bandas (ver Materiales y Métodos; ver Apéndice: Fig. A3 y A4). La cuantificación de diversidad alfa presentó valores de entre 27 y 54 para el número de bandas observadas, mientras que el índice de Shannon varió entre 3,2 y 3,9 (Fig. 5A y 5B, respectivamente).



**Figura 5:** Análisis preliminar de la diversidad de lodos activados en electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. (A) La riqueza fue representada por el número de bandas observadas por muestra. (B) El índice de Shannon integra la riqueza y la equitatividad.

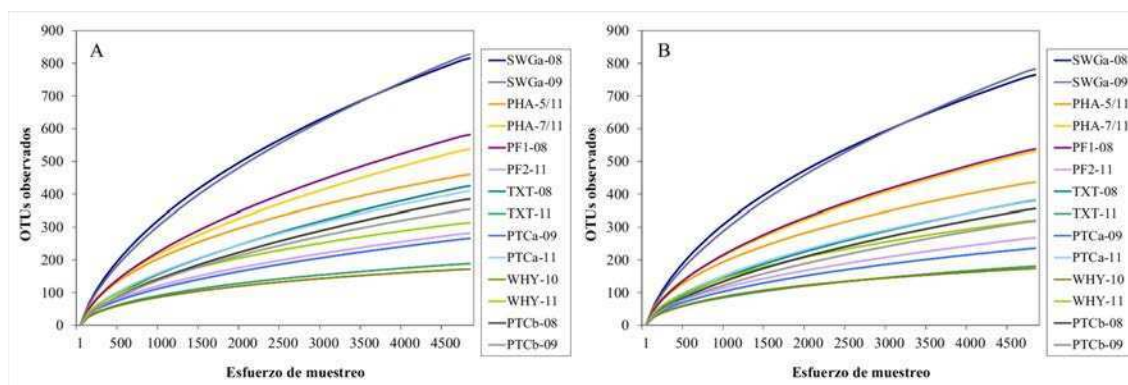
### **Secuenciación de amplicones: Estructura de la comunidad bacteriana a niveles taxonómicos altos**

Para las 14 muestras del análisis, se amplificó la región V1-V3 a partir de ADN metagenómico total, con cebadores etiquetados que permitieron la pirosecuenciación de todos los amplicones en simultáneo. El ensayo de pirosecuenciación generó un total de 203.900 lecturas, de las cuales 156.988 fueron lecturas de alta calidad, distribuidas entre las 14 muestras, quedaron disponibles para el análisis luego del filtrado y procesamiento completo (Tabla 8). Con el propósito de asegurar una cobertura pareja, se tomaron 5.000 lecturas procesadas por muestra al azar. El largo promedio fue de 423 pb, con un mínimo de 200 pb y un máximo de 530 pb.

**Tabla 8:** Número de lecturas a lo largo del procesamiento, e índices ecológicos de las muestras basadas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) definidas al 97% de similitud.

ID	Lecturas crudas	Luego filtrado de calidad inicial ( <i>trim.flows</i> )	Luego del procesamiento con 'mothur'	Cobertura de Good	OTUs observadas	Chao1	ACE	Shannon
TXT-08	20437	15636	15391	0,95	425	886	1263	3,83
TXT-11	8051	6236	6212	0,98	189	321	361	2,93
PTCb-08	14377	11970	11606	0,95	385	715	1221	3,35
PTCb-09	16676	13566	13314	0,96	354	616	827	2,77
PTCa-09	14570	10870	10739	0,97	266	556	813	2,85
PTCa-11	6601	4839	4753	0,95	409	855	1157	3,96
PHA-5/11	24749	18926	18810	0,95	460	802	1028	4,42
PHA-7/11	13807	9324	9252	0,94	538	1124	1692	4,56
SWGa-08	8719	7040	6860	0,91	816	1576	2157	5,68
SWGa-09	10396	8263	8087	0,90	828	1782	2724	5,45
WHY-10	20130	16980	16016	0,99	172	245	242	2,63
WHY-11	10558	8848	8422	0,97	314	510	701	3,81
PF1-08	24774	20025	19756	0,93	582	1213	1896	4,29
PF2-11	10055	7819	7753	0,97	282	597	821	3,65

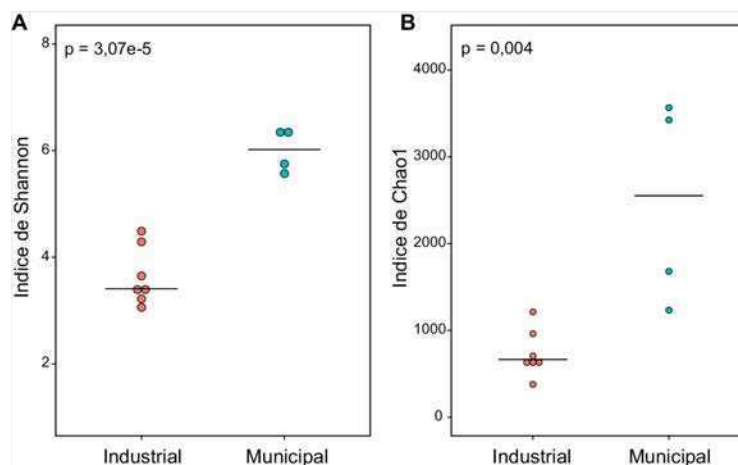




**Figura 6:** Curvas de rarefacción para muestras de lodos activados en base a OTUs definidas a (A) 97% y (B) 95% de similitud entre secuencias.

Aunque los valores para la cobertura de Good se correspondieron con muestras secuenciadas en profundidad (Tabla 8), las curvas de rarefacción construidas a partir de OTUs definidas al 97% de similitud no presentaron saturación ante un esfuerzo de muestreo creciente (Fig. 6), indicando que habían quedado taxones bacterianos poco abundantes sin detectar. Por otro lado, las curvas de rarefacción permitieron observar que la diversidad taxonómica en lodos industriales podría ser menor que en lodos municipales. Los cálculos de índices de diversidad de la totalidad de las muestras, incluyendo los datos de las plantas municipales de China, Singapur y Corea del Sur, verificaron la existencia de una diferencia significativa entre ambos grupos (Fig. 7).

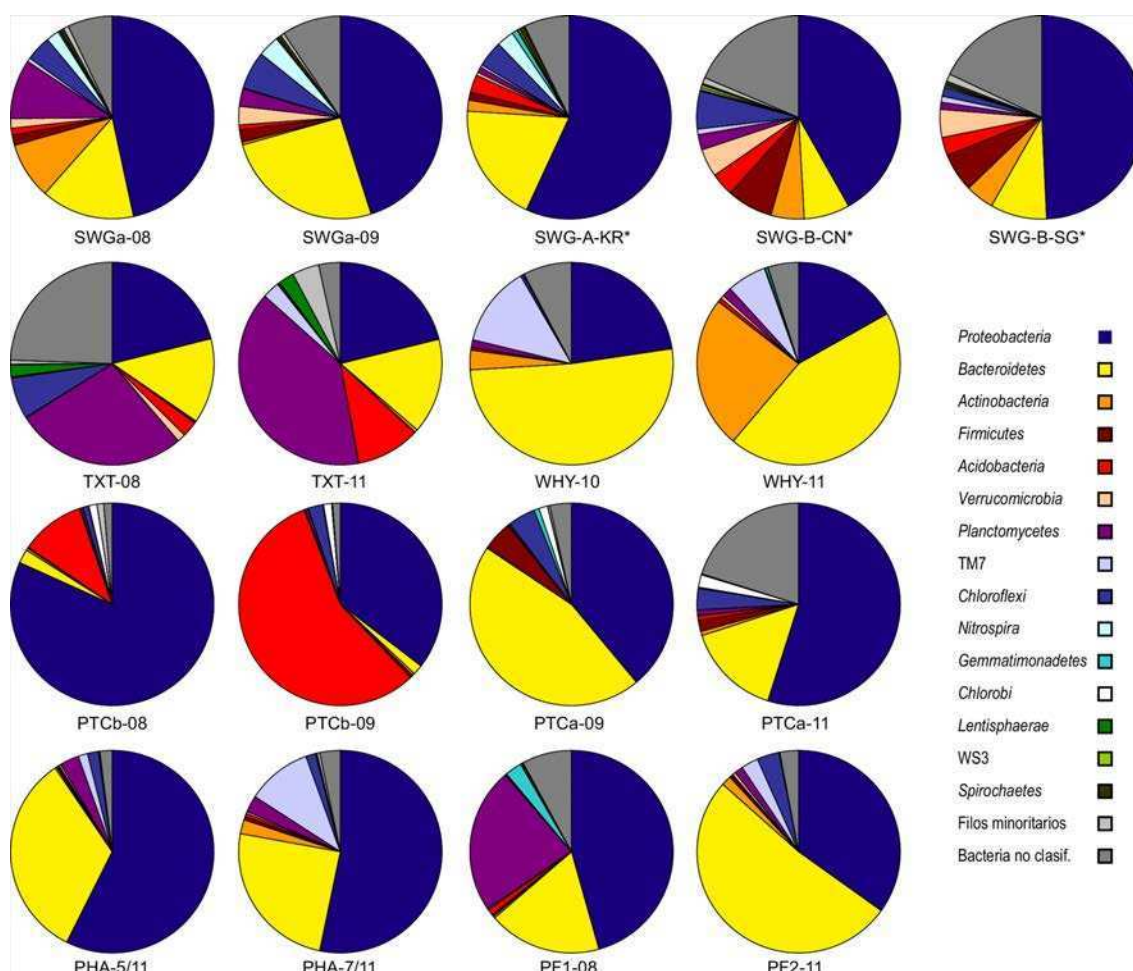
A partir de la clasificación taxonómica de las secuencias contra la base de datos del RDP, se realizó el análisis de la composición bacteriana a diferentes niveles jerárquicos (Tablas A1, A2, A3, Apéndice). Para los niveles superiores de filo y clase, cada comunidad de lodos activados presentó una distribución característica (Fig. 8 y 9). La clase *Sphingobacteria*, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, estuvo altamente representada en la mayoría de las muestras, con abundancias relativas de entre 10 y 50%, a excepción de los lodos de la industria de polímeros, en donde fue un componente minoritario (alrededor del 1%). Por el contrario, los miembros del filo *Acidobacteria* (Grupo Gp4) dominaron esta última comunidad (10 y 56%). En la planta de tratamiento de la tintorería textil, *Acidobacteria* fue relativamente abundante (hasta 10%), pero no así en el resto de las depuradoras analizadas.



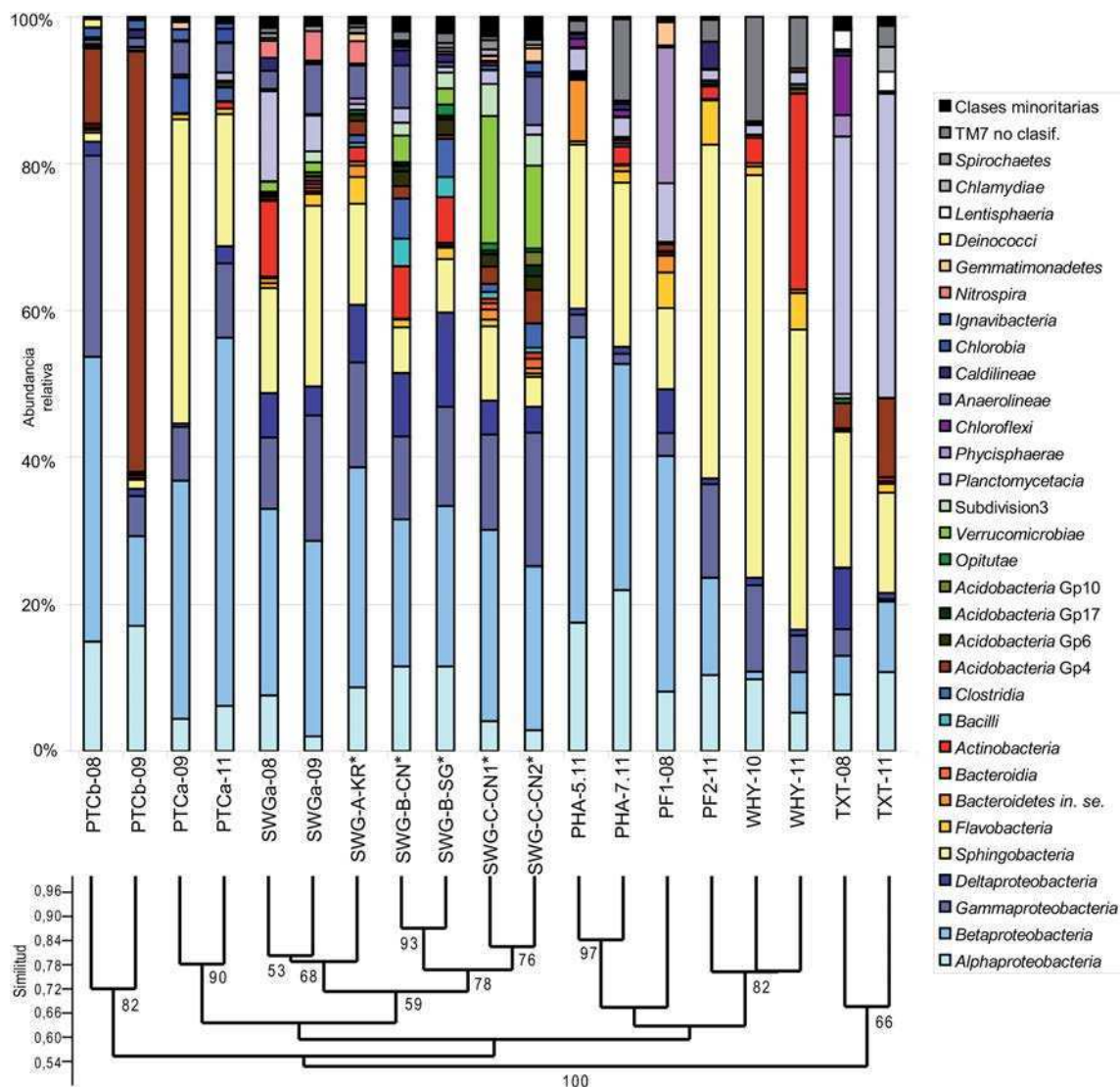
**Figura 7:** Índices de diversidad (A) Shannon y (B) Chao1 para lodos activados industriales (n=7) y municipales (n=4). Se hallaron diferencias significativas entre las medias (Prueba de t,  $p < 0,01$ ).

Dentro del filo *Proteobacteria*, la clase *Betaproteobacteria* fue otro componente mayoritario en un gran número de plantas de tratamiento (12-40%), con valores menores en lodos activados de la industria textil y del procesamiento de suero lácteo (1-9%). Los órdenes *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales* y *Rhodocyclales* fueron los principales exponentes dentro de esta clase. El grupo *Gammaproteobacteria* mostró tanto dominancia (planta de la industria de polímeros, 27%) como baja abundancia (muestras relacionadas a la industria textil y farmacéutica, 1-3%), así como también abundancias moderadas (plantas restantes, 3-14%). El filo *Actinobacteria* fue detectado en todas las PTEs, aunque presentó valores de abundancia altos particularmente en una de las muestras municipales y en una de las vinculadas al procesamiento de suero lácteo (9 y 24%). En la depuradora del efluente textil se encontró una fuerte presencia del filo *Planctomycetes* (27 y 40%), mientras que en la planta cloacal, en la farmacéutica y en la de alimento para mascotas presentó abundancias moderadas a bajas (3-10%, 2% y 21%, respectivamente). El filo candidato TM7, un grupo todavía poco estudiado, exhibió una notoria abundancia en la PTE de la filtración de suero lácteo (6 y 13%), y abundancias menores en la planta relacionada al efluente farmacéutico (2 y 10%) y en una de las que tratan el efluente de la elaboración de alimentos para mascotas (3%).

Algunos filos fueron detectados sólo en sitios específicos. Tal fue el caso de los grupos *Verrucomicrobia* y *Spirochaetes*, presentes de forma exclusiva en la comunidad de lodos activados cloacales (2-3% y 1%, respectivamente), y del filo *Chlorobi*, haciendo lo propio en lodos activados vinculados a la actividad petroquímica (refinería de petróleo, 1-2%; síntesis de polímeros, 1%). Por último, en la planta de la tintorería textil se hallaron secuencias asociadas a un filo poco común, conocido como *Lentisphaerae*, en valores de abundancias no despreciables (2-3%).



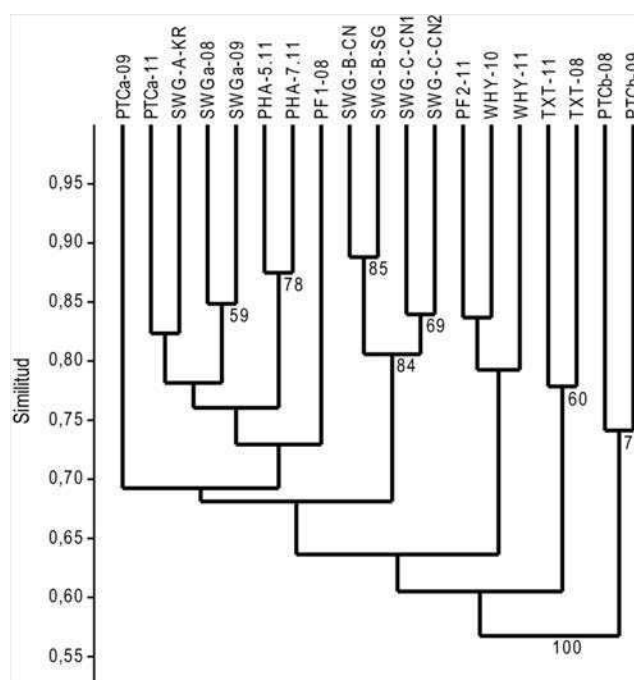
**Figura 8:** Patrón de distribución bacteriana en sistemas de lodos activados. Cada gráfico de torta exhibe las abundancias relativas de diferentes filos bacterianos en las PTEs indicadas. Los filos con abundancias menores a 1% fueron agrupados como 'Filos minoritarios'. Las muestras marcadas con un asterisco corresponden a plantas municipales analizadas por otros laboratorios (ver Materiales y Métodos).



**Figura 9:** Patrón de distribución de clases bacterianas en sistemas de lodos activados. El análisis de agrupamiento fue realizado en base al índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio, sin incluir a las bacterias no clasificadas a nivel de clase. Como insumo se tomó la raíz cuadrada de las abundancias relativas. El índice de confianza sobre 100 iteraciones se muestra sólo cuando supera el valor 50. Las muestras marcadas con un asterisco fueron obtenidas por otros laboratorios y corresponden a plantas municipales (ver Materiales y Métodos).

En base a esta información de taxones de alto rango, se realizaron dos análisis de agrupamiento utilizando el índice de similitud Bray-Curtis. El primero, a nivel de clase, mostró un agrupamiento de las muestras según su identidad de PTE, con altos valores de *bootstrap* (Fig. 9). Aquí se incluyeron datos de plantas municipales publicados por otros tres laboratorios: dos plantas depuradoras de gran escala en China y Singapur, otras dos PTEs de gran escala en China, y una planta piloto de proceso A/A/O en Corea del Sur

(ver Materiales y Métodos). En el resultado del análisis es posible observar cómo las cinco muestras de plantas domésticas forman un único agrupamiento. Además, el mismo se separa en dos ramificaciones principales, coincidentes con la amplificación de dos regiones variables del ARNr 16S diferentes. En el caso del análisis a nivel de filo, valores menores de *bootstrap* indicaron una mayor incertidumbre en las ramificaciones del dendrograma, hecho posiblemente vinculado a la menor cantidad de grupos con valores de abundancia altos y medios (Fig. 10).



**Figura 10:** Análisis de agrupamiento de comunidades bacterianas de lodos activados a nivel de filo, basado en la medida de similitud Bray-Curtis, utilizando la raíz cuadrada de las abundancias relativas mayores a 0,1%. Sólo se muestran valores de *bootstrap* superiores a 50.

### **Comunidades bacterianas a nivel de género**

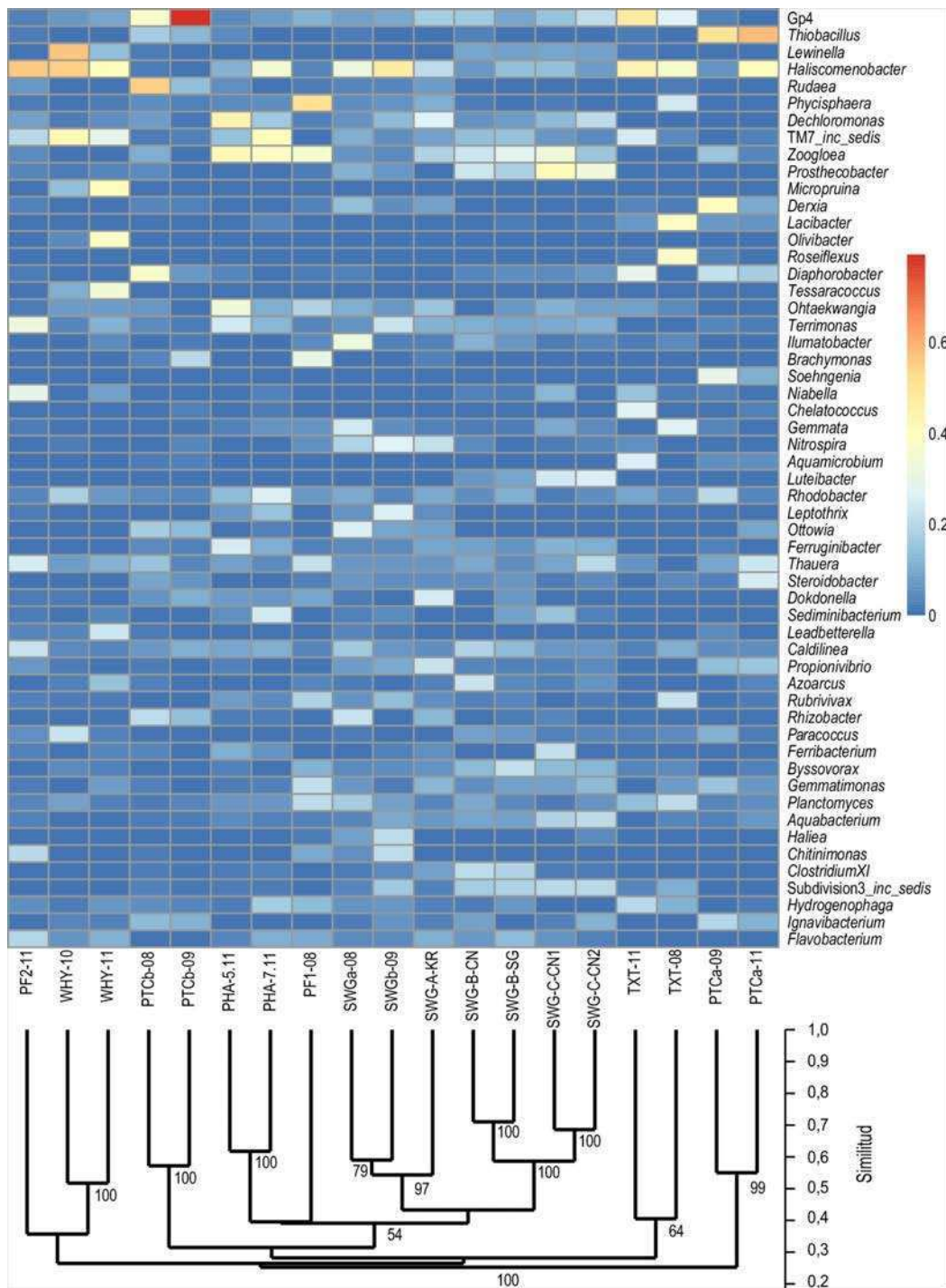
En el proceso de clasificación, no todas las secuencias lograron ser asignadas hasta el nivel de género bacteriano. Para este trabajo, la proporción de las que fueron clasificadas varió notoriamente entre muestras, siendo 34-41% en muestras de la refinería de petróleo y 72-89% en las muestras vinculadas a la síntesis de polímeros acrílicos (Tabla 9). El patrón de abundancias de géneros fue colapsado en un dendrograma correspondiente a un nuevo análisis de agrupamiento utilizando la similitud Bray-Curtis. El índice de similitud presentó valores menores respecto a los ya

calculados para los niveles de filo y clase, hecho de esperar ante el aumento de variables (taxones). No obstante, el perfil de agrupamiento continuó siendo guiado por la identidad de las PTEs y por el efluente municipal. En este último grupo, se conservó el efecto dado por las diferentes regiones hipervariables secuenciadas (V1-V3 y V4) (Fig. 11)

**Tabla 9:** Proporción de secuencias (%) que fueron clasificadas hasta el nivel taxonómico de género en cada PTE.

Muestra	Secuencias clasificadas (%)
TXT-08	35,9
TXT-11	43,5
PTCa-09	43,5
PTCa-11	43,6
PTCa-11	72,0
PTCa-11	89,0
PHA-5.11	67,1
PHA-7.11	64,5
SWGa-08	56,8
SWGa-09	49,1
WHY-10	73,7
WHY-10	69,9
PF1-08	58,6
PF2-11	65,7

A nivel taxonómico de género, no fue posible detectar un grupo de taxones común a todos los sistemas de tratamiento censados. Los géneros *Haliscomenobacter* (hasta 23%) y *Thauera* (hasta 4%) representaron lo más cercano a ese concepto, encontrándose en la mayorías de las PTEs. Luego, ciertos géneros compartidos por numerosas plantas de tratamiento presentaron altas proporciones sólo en algunas de ellas. Entre ellos se encontraron miembros del género Gp4 (filo *Acidobacteria*), particularmente abundantes en las muestras de lodos de la planta de efluentes de la síntesis de polímeros (10-52%) y de la tintorería textil (2-10%). Por último, se hallaron géneros abundantes exclusivos de ciertas plantas depuradoras. Fue el caso de *Lewinella*, *Micropruina*, *Olivibacter* y *Tessaracoccus*, con marcada presencia en lodos activados del procesamiento de suero lácteo (1-23%, 1-11%, 0-10%, 1-8%, respectivamente), *Thiobacillus* (9-15%) en la PTE de la refinería de petróleo, y *Rudaea* (2-22%) un género destacado del lodo vinculado a la síntesis de polímeros.



**Figura 11:** Los géneros bacterianos de mayor abundancia en los lodos activados censados, presentados en un mapa de calor que se corresponde con su abundancia relativa. El análisis de agrupamiento se realizó sobre los 184 géneros con mayor representación (géneros no clasificados incluidos, abundancia >0,5%), utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis y el método de agrupamiento de enlace promedio.

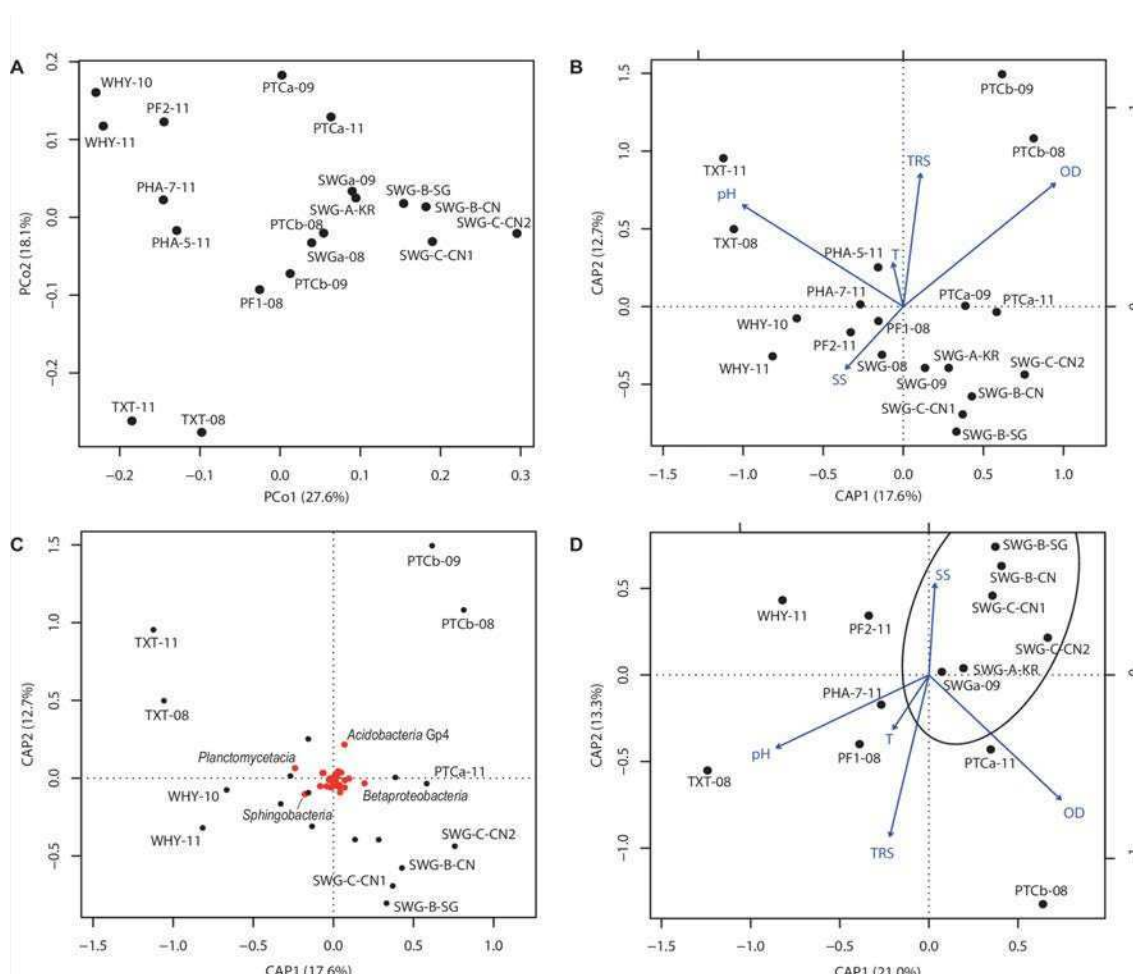
## **Relación entre parámetros operacionales y la estructura de la comunidad**

### **bacteriana**

Los análisis de ordenamiento son herramientas estadísticas de gran valor que permiten exhibir la estructura de los datos de una manera compacta y altamente informativa. En este trabajo se utilizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) junto a su par Canónico (CAP) para visualizar patrones generales de dispersión entre las comunidades de las diferentes PTEs, y para examinar las correlaciones entre las comunidades bacterianas y las variables de operación críticas del proceso (Fig. 12). Los dos primeros ejes del PCoA no restringido explicaron el 45,7% de la varianza observada (Fig. 12A), mientras que los primeros dos ejes del mismo análisis pero restringido por las variables del proceso, explicaron el 30,3% de la variación restringida. A modo complementario se realizó un Análisis de Correspondencia Canónico, en el que ese mismo valor fue de 31,8% (Fig. 13). En todos ellos, las muestras se agruparon nuevamente por su origen, es decir, por PTE, y al mismo tiempo las muestras de lodos activados municipales se agruparon de forma estrecha diferenciándose de las muestras industriales. Dentro de estas últimas, las comunidades bacterianas de las plantas de la tintorería textil y de la procesadora de suero lácteo fueron las que presentaron valores especialmente distintivos dentro del ordenamiento respecto al grupo municipal.

En un análisis CAP adicional con prueba de hipótesis (Fig. 12D), se incluyó sólo una muestra de las PTEs que contaban con muestras a tiempos diferentes, con el propósito de no violar el supuesto de independencia. A pesar de esta modificación, el patrón de ordenamiento se conservó respecto a las figuras 12B y 12C. Las muestras de las PTEs municipales formaron un conjunto relativamente separado de las restantes comunidades de lodos a lo largo de los dos ejes principales, ocupando un espacio de confianza representado por una elipse (95%). La prueba de hipótesis no paramétrica basada en permutaciones indicó que los valores promediados de oxígeno disuelto (OD) y pH presentaron asociaciones significativas con la variación de las estructuras de las comunidades bacterianas ( $p=0,01$  y  $p=0,02$ , respectivamente).

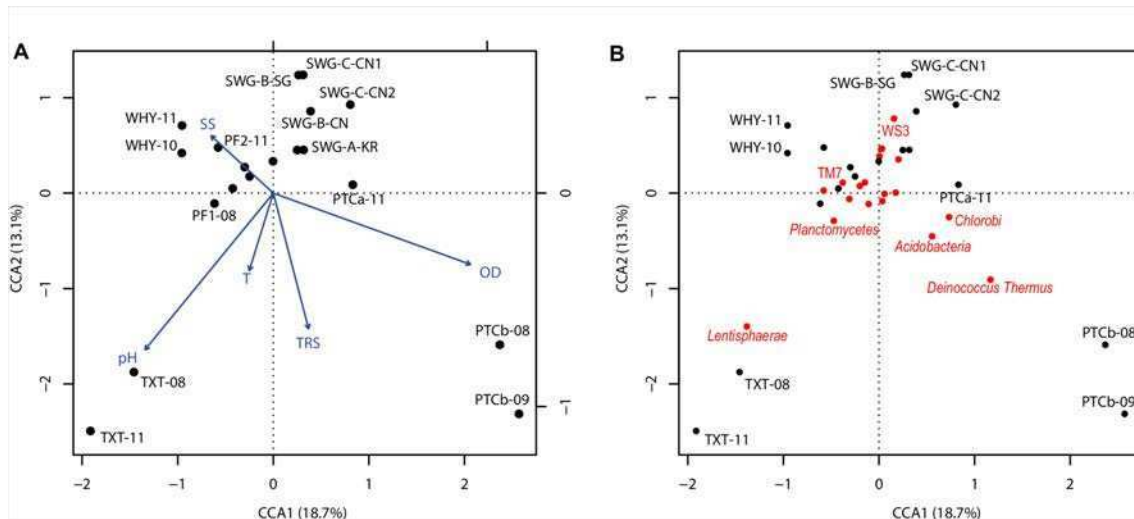




**Figura 12:** Análisis de ordenamiento de datos de pirosecuenciación y variables operacionales en muestras de lodos activados. A) Análisis de Coordenadas Principales sobre la disimilitud Bray-Curtis entre las muestras representadas por las abundancias relativas de clases bacterianas. B) y C) Análisis de Coordenadas Principales Restringido, utilizando las abundancias relativas de clases bacterianas y cinco parámetros operacionales: pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura (T), tiempo de retención de sólidos (TRS), y sólidos en suspensión (SS). Las flechas indican la dirección y la magnitud de la asociación de las variables operacionales con la estructura de la comunidad bacteriana. Por claridad, los taxones fueron representados por puntos rojos, y sólo los puntos de mayor asociación fueron rotulados. El código de tres letras indica la procedencia del agua residual tratada por lodos activados, seguido del año de muestreo (ver Tablas 1 y 2). (D) El mismo análisis de B y C, solo que con una única muestra por planta. La elipse indica el intervalo de confianza del 95 % para el centroide de las plantas de tratamiento municipales.

Por las figuras que incluyen información de grupos bacterianos salientes, es posible asociar nuevamente a taxones de alto rango con sitios particulares. El filo *Lentisphaera*, y en menor medida la clase *Planctomycetacia*, mostraron estar especialmente confinados a la planta depuradora de la tintorería textil. El filo *Chlorobi* fue distintivo de la muestra vinculada a la refinería de petróleo. Un grupo raro y de muy baja

abundancia, WS3, se presentó como característico de las comunidades de plantas municipales. Por último, la clase Gp4 de las *Acidobacteria* junto con un grupo muy minoritario, *Deinococcus-Thermus*, exhibieron su asociación a la comunidad de lodos activados que trata el efluente proveniente de la síntesis de polímeros.



**Figura 13:** Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) basado en filos bacterianos y parámetros operacionales. Para el análisis se consideró a los filos con abundancias mayores a 1%. La fracción restringida constituye el 43,9% de la inercia total. Por mayor claridad, sólo se rotularon puntos relativamente distanciados del origen de coordenadas.

### 3. SECUENCIACIÓN AL AZAR DE ADN METAGENÓMICO

#### **Plantas de tratamiento de efluentes analizadas**

Para el estudio basado en secuenciación al azar se trabajó con seis de las ocho plantas de tratamiento localizadas en Argentina que habían sido analizadas por pirosecuenciación de amplicones. Se incluyeron muestras tomadas en dos tiempos diferentes y réplicas técnicas del proceso de secuenciación masiva (ver Materiales y Métodos). Con el fin de ampliar el alcance del trabajo, se analizaron muestras secuenciadas por laboratorios de otros países (India y China), disponibles en bases públicas de datos, sumando un total de 32 muestras metagenómicas. Las muestras de India provenían de dos PTEs que tratan efluentes de tipo petroquímicos, mientras que las muestras de China habían sido tomadas de plantas de tratamiento que reciben efluentes municipales.

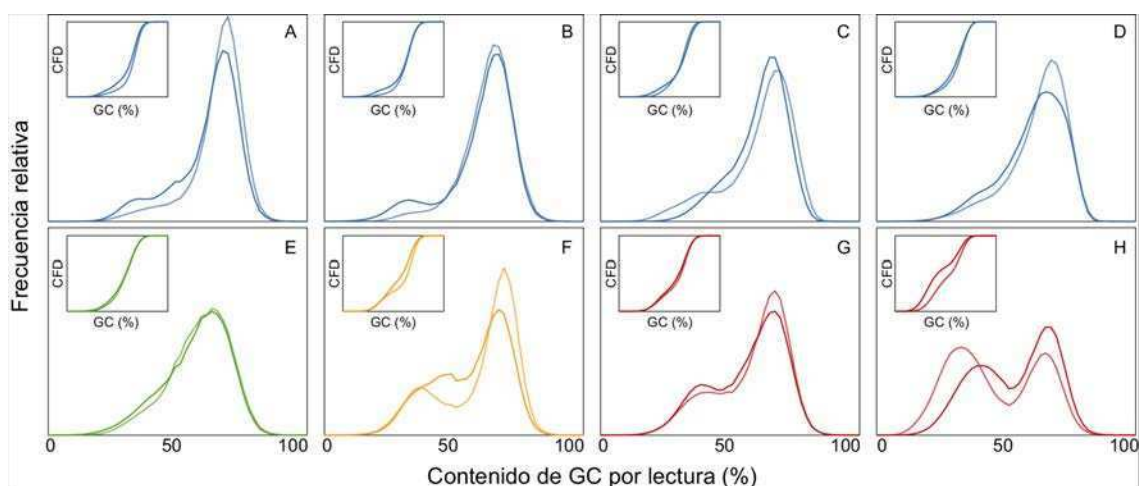
#### **Descripción general de los datos generados por secuenciación al azar**

Se obtuvo un alto número de lecturas por muestra (13 millones, en promedio). Los datos primarios fueron analizados por las herramientas del servidor MG-RAST. Entre 85% y 93% de las lecturas totales correspondientes a las dos plantas municipales y las cuatro plantas industriales incluidas en este análisis pasaron el control de calidad. El conjunto de datos filtrado presentó entre 34% y 60% de anotaciones asignadas a proteínas de función conocida, y 27-53% de lecturas conteniendo proteínas predichas de función desconocida (Tabla 10). La clasificación en categorías taxonómicas mostró una marcada dominancia del dominio *Bacteria* (96,6-98,9%). El resto de las lecturas se distribuyó entre los dominios *Archaea* (0,4-1,1%), *Eukarya* (0,6-2,3%) y virus (0,02-0,07%).

**Tabla 10:** Obtención de datos, características generales preliminares luego del procesamiento con MG-RAST, y códigos de acceso en bases de datos. En el caso de las muestras de Argentina, los valores representan el promedio entre réplicas técnicas. Los rótulos de las muestras de otros laboratorios fueron resaltados con letra itálica.

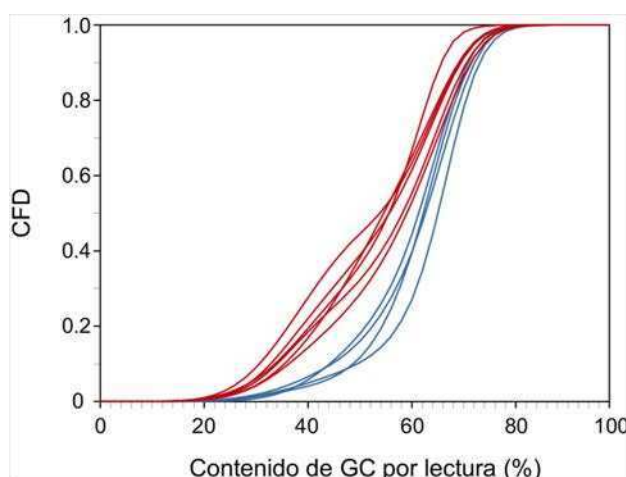
Rótulo	Extracción ADN	Tecnología de secuenciación	Número de lecturas	Nro. lecturas alta calidad <sup>1</sup>	Regiones codificantes – Proteínas <sup>1</sup>	MG-RAST ID	NCBI-SRA ID
PtcA-09	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,51x10 <sup>7</sup>	1,30x10 <sup>7</sup> (86,6)	6,73x10 <sup>6</sup> (51,4)	4603523.3; 4603525.3	PRJNA288131
PtcA-11	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,23x10 <sup>7</sup>	1,05x10 <sup>7</sup> (85,7)	5,03x10 <sup>6</sup> (47,8)	4603527.3; 4603529.3	PRJNA288131
PtcB-08	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,37x10 <sup>7</sup>	1,20x10 <sup>7</sup> (87,5)	6,90x10 <sup>6</sup> (57,1)	4603531.3; 4603533.3	PRJNA288131
PtcB-09	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,35x10 <sup>7</sup>	1,18x10 <sup>7</sup> (87,2)	6,71x10 <sup>6</sup> (56,9)	4603535.3; 4603537.3	PRJNA288131
Txt-08	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,05x10 <sup>7</sup>	9,10x10 <sup>6</sup> (87,0)	4,83x10 <sup>6</sup> (53,0)	4603539.3; 4603541.3	PRJNA288131
Txt-11	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,25x10 <sup>7</sup>	1,09x10 <sup>7</sup> (87,5)	6,66x10 <sup>6</sup> (60,5)	4603543.3; 4603545.3	PRJNA288131
Why-10	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,56x10 <sup>7</sup>	1,39x10 <sup>7</sup> (89,3)	8,44x10 <sup>6</sup> (60,5)	4603547.3; 4603549.3	PRJNA288131
Why-11	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,25x10 <sup>7</sup>	1,09x10 <sup>7</sup> (87,8)	5,66x10 <sup>6</sup> (51,6)	4603551.3; 4603553.3	PRJNA288131
SwgA-08	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,33x10 <sup>7</sup>	1,23x10 <sup>7</sup> (92,3)	9,47x10 <sup>6</sup> (76,8)	4603555.3; 4603557.3	PRJNA288131
SwgA-13	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,07x10 <sup>7</sup>	9,81x10 <sup>6</sup> (92,1)	7,34x10 <sup>6</sup> (74,9)	4603559.3; 4603561.3	PRJNA288131
SwgB-12	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,51x10 <sup>7</sup>	1,39x10 <sup>7</sup> (92,1)	9,52x10 <sup>6</sup> (68,6)	4603563.3; 4603565.3	PRJNA288131
SwgB-13	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq1500	1,51x10 <sup>7</sup>	1,40x10 <sup>7</sup> (93,3)	9,01x10 <sup>6</sup> (64,2)	4603567.3; 4603569.3	PRJNA288131
<i>Otros laboratorios</i>							
<i>PtcC-13</i>	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina NextSeq500	4,42x10 <sup>6</sup>	4,08x10 <sup>6</sup> (92,2)	3,09x10 <sup>6</sup> (75,8)	4660921.3	SRR1702225
<i>PtcC-14</i>	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina NextSeq500	4,42x10 <sup>6</sup>	4,60x10 <sup>6</sup> (91,6)	3,67x10 <sup>6</sup> (79,8)	4636805.3	SRR1702234
<i>PtcD-13</i>	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina NextSeq500	5,28x10 <sup>6</sup>	4,81x10 <sup>6</sup> (91,0)	3,15x10 <sup>6</sup> (65,6)	4660920.3	SRR1702232
<i>PtcD-14</i>	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina NextSeq500	5,28x10 <sup>6</sup>	3,98x10 <sup>6</sup> (92,2)	3,30x10 <sup>6</sup> (82,9)	4636804.3	SRR1702233
<i>SwgC</i>	NA	Illumina HiSeq2000	1,25x10 <sup>7</sup>	1,11x10 <sup>7</sup> (89,4)	9,26x10 <sup>6</sup> (83,1)	4629717.3	SRR1106701
<i>SwgD</i>	NA	Illumina HiSeq2000	1,21x10 <sup>7</sup>	1,07x10 <sup>7</sup> (88,3)	8,43x10 <sup>6</sup> (78,6)	4629718.3	SRR1106709
<i>SwgE</i>	NA	Illumina HiSeq2000	6,78x10 <sup>6</sup>	6,62x10 <sup>6</sup> (97,6)	5,70x10 <sup>6</sup> (86,1)	4660919.3	SRR1106873
<i>SwgF</i>	FastDNA Spin Kit for Soil	Illumina HiSeq2000	1,67x10 <sup>7</sup>	1,57x10 <sup>7</sup> (93,9)	1,13x10 <sup>7</sup> (72,1)	4629725.3	SRR609293

<sup>1</sup>Entre paréntesis se detalla el porcentaje respecto al valor de la columna anterior.



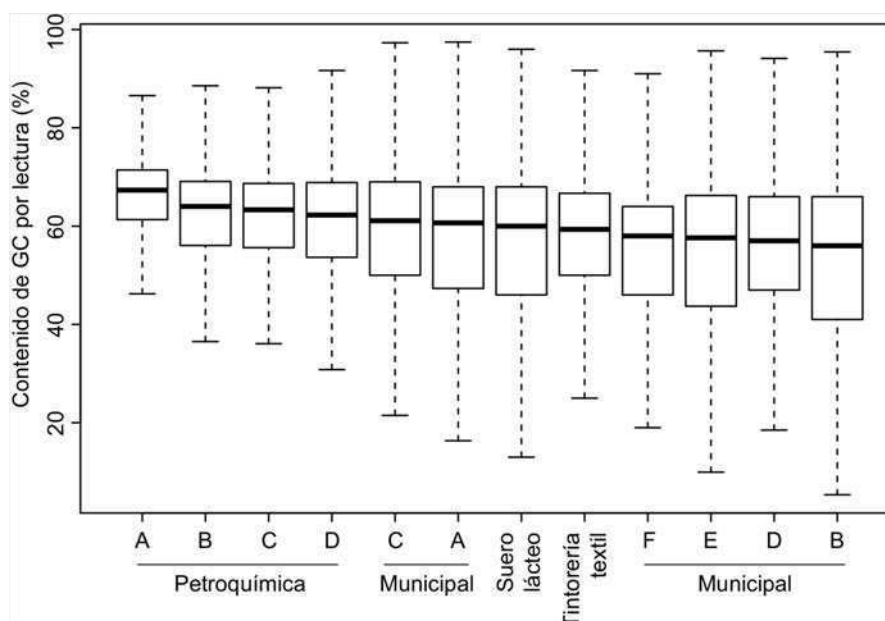
**Figura 14:** Comparación del contenido de GC por secuencia (%) de lodos activados municipales e industriales. (A-D) Petroquímica, (E) textil, (F) suero lácteo, (G-H) municipal (SwgA y SwgB, respectivamente). Los recuadros internos presentan la distribución de frecuencia acumulativa empírica (CFD, del inglés *Cumulative Frequency Distribution*). Las líneas continuas y punteadas corresponden a diferentes tiempos de muestreo.

El análisis de la composición nucleotídica basado en el contenido de guanósina y citosina (GC) por lectura puso de manifiesto que a cada PTE, incluyendo a aquellas que han sido secuenciadas por otros laboratorios, las distingue un perfil característico, el cual se reproduce en los 2 tiempos muestreados, sugiriendo una similitud filogenética de las comunidades microbianas dentro de cada planta depuradora, que se conserva en el tiempo (Fig. 14). Además, los patrones de contenido de GC presentes en lodos activados que tratan diferentes tipos de efluentes mostraron una clara diferencia. Las muestras provenientes de PTEs municipales presentaron un patrón amplio, con dos picos (35% y 70% de GC, aproximadamente), mientras que las muestras vinculadas a la actividad petroquímica exhibieron una distribución más estrecha, con un pico preponderante ubicado hacia el extremo superior del contenido de GC (Fig. 14). Mediante la representación de la función de distribución acumulativa empírica (CFD) del porcentaje de GC en lecturas metagenómicas (Fig. 15), fue posible diferenciar, desde otra perspectiva, los patrones de contenido de GC correspondientes a las comunidades microbianas de lodos activados municipales y petroquímicos, con medianas de 51-61% y 63-65% respectivamente (Fig. 16).



**Figura 15:** Distribución de frecuencia acumulativa empírica (CFD) para el contenido de GC por secuencia (%) en datos metagenómicos de PTEs petroquímicas (azul) y municipales (rojo).

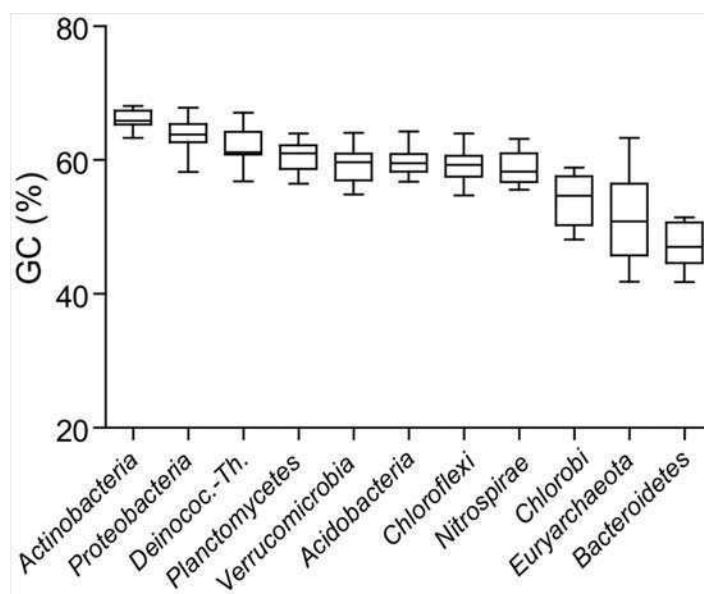
A continuación se analizó el contenido de GC para cada uno de los filos representados en todas las PTEs ( $n=12$ ). Los conjuntos de lecturas se confeccionaron de acuerdo a la asignación taxonómica realizada sobre las lecturas no ensambladas. *Actinobacteria* fue el filo de mayor porcentaje de contenido de GC por lectura (%), al tiempo que *Bacteroidetes* se ubicó en el extremo opuesto. *Actinobacteria* fue, además, el filo de menor varianza, mientras que *Euryarchaeota* exhibió alta variación entre sus lecturas. El resto de los filos presentó una variabilidad intermedia ( $<10\%$ ) (Fig. 17). Las razones que explican la variación en el contenido de GC no están esclarecidas. Podrían estar relacionados a factores intrínsecos y específicos de cada organismo, o bien a factores externos, así como ser el resultado de procesos neutrales. Con el objetivo de estudiar el contenido de GC en relación al gradiente ambiental formado por las diferentes PTEs, se realizó una correlación múltiple de rangos (correlación de Spearman) entre filos, en donde un 50% arrojó valores positivos significativos para el coeficiente de correlación ( $\rho > 0,56$ ;  $p \leq 0,05$ ; Tabla 11). A su vez, correlaciones múltiples de rangos entre las distribuciones de los distintos filos y distribuciones promedio excluyendo ese mismo filo, exhibieron valores significativos para 7 de los 11 filos representados en todas las muestras. Para descartar el efecto del filo mayoritario, *Proteobacteria*, se repitió lo anterior excluyendo a los diferentes filos sucesivos junto al filo *Proteobacteria*, con un resultado muy similar (Tabla 12).



**Figura 16:** Contenido de GC por lectura para cada una de las plantas de tratamiento de efluentes analizadas. Las plantas fueron ordenadas según una mediana decreciente.

**Tabla 11:** Coeficientes de Spearman (correlación por rangos) para correlaciones múltiples de a pares entre los 11 filos más representados, utilizando los valores de contenido de GC a lo largo de las PTE ( $n=12$ ). Los valores  $p>0,56$  y  $p\leq 0,05$  fueron resaltados. Los nombres de los filos fueron abreviados para facilitar su incorporación en la tabla. Actb: *Actinobacteria*; Prtb: *Proteobacteria*; Bctr: *Bacteroidetes*; Plct: *Planctomycetes*; Acdb: *Acidobacteria*; Vrcm: *Verrucomicrobia*; Clfx: *Chloroflexi*; Ntrp: *Nitrospirae*; Clrb: *Chlorobi*; Euch: *Euryarchaeota*; DcTh: *Deinococcus-Thermus*.

	Actb.	Prtb.	Bctr.	Plct.	Acdb.	Vrcm.	Clfx.	Ntrp.	Clrb.	Euch.	DcTh
Actb.	-	0,31	0,05	0,24	0	0,05	0,29	0,38	0,2	0,29	0,39
Prtb.	0,31	-	0,41	<b>0,65</b>	0,14	0,45	0,33	<b>0,72</b>	0,13	<b>0,74</b>	<b>0,73</b>
Bctr.	0,05	0,41	-	0,46	0,35	<b>0,68</b>	<b>0,58</b>	0,13	0,48	0,55	0,4
Plct.	0,24	<b>0,65</b>	0,46	-	<b>0,7</b>	<b>0,78</b>	<b>0,81</b>	<b>0,63</b>	<b>0,66</b>	<b>0,74</b>	<b>0,87</b>
Acdb.	0	0,14	0,35	<b>0,7</b>	-	<b>0,85</b>	<b>0,76</b>	0,35	<b>0,93</b>	0,45	0,37
Vrcm.	0,05	0,45	<b>0,68</b>	<b>0,78</b>	<b>0,85</b>	-	<b>0,87</b>	0,41	<b>0,84</b>	<b>0,71</b>	0,56
Clfx.	0,29	0,33	<b>0,58</b>	<b>0,81</b>	<b>0,76</b>	<b>0,87</b>	-	0,26	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,64</b>
Ntrp.	0,38	<b>0,72</b>	0,13	<b>0,63</b>	0,35	0,41	0,26	-	0,28	<b>0,7</b>	<b>0,66</b>
Clrb.	0,2	0,13	0,48	<b>0,66</b>	<b>0,93</b>	<b>0,84</b>	<b>0,8</b>	0,28	-	0,46	0,38
Euch.	0,29	<b>0,74</b>	0,55	<b>0,74</b>	0,45	<b>0,71</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	0,46	-	<b>0,62</b>
DcTh	0,39	<b>0,73</b>	0,4	<b>0,87</b>	0,37	0,56	<b>0,64</b>	<b>0,66</b>	0,38	<b>0,62</b>	-



**Figura 17:** Contenido de GC por lectura para cada uno de 11 filos ampliamente representados luego de la clasificación de las lecturas metagenómicas contra la base de datos M5nr. Los filos fueron ordenados según una mediana decreciente.

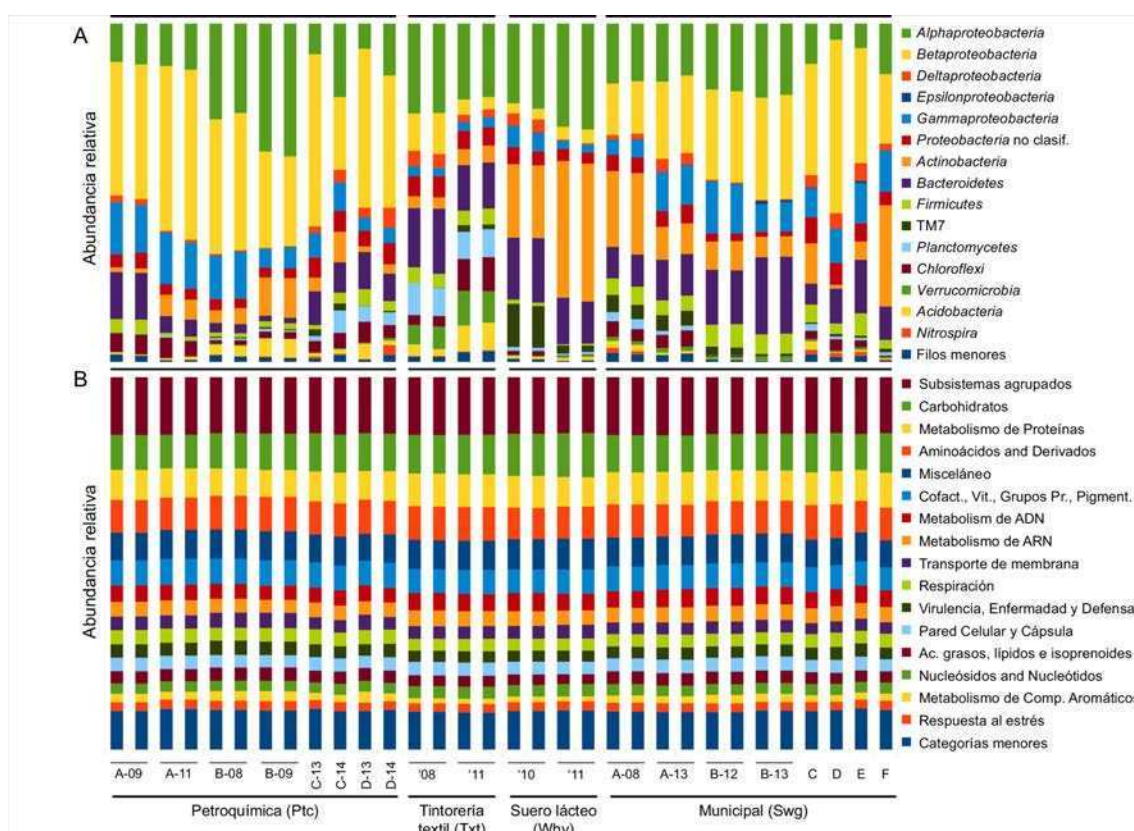
**Tabla 12:** Coeficientes para la correlación de Spearman (correlación por rangos) entre el contenido de GC de las lecturas asignadas a un filo y el promedio del total excluyendo (A) a las lecturas de ese mismo filo o (B) a las lecturas de ese filo y las del filo dominante, *Proteobacteria*, a lo largo de las muestras (n=12). Los valores  $p \leq 0,05$  fueron resaltados.

Phylum	A		B	
	$\rho$	p-value	$\rho$	p-value
<i>Acidobacteria</i>	0,47	0,13	0,46	0,14
<i>Actinobacteria</i>	0,48	0,12	0,46	0,13
<i>Bacteroidetes</i>	0,48	0,12	0,49	0,11
<i>Chlorobi</i>	0,55	0,06	0,56	0,06
<i>Chloroflexi</i>	0,75	<b>0,01</b>	0,76	<b>&lt; 0,01</b>
<i>Deinococcus-Th.</i>	0,87	<b>&lt; 0,01</b>	0,87	<b>&lt; 0,01</b>
<i>Euryarchaeota</i>	0,81	<b>&lt; 0,01</b>	0,78	<b>&lt; 0,01</b>
<i>Nitrospirae</i>	0,63	<b>0,03</b>	0,59	<b>0,04</b>
<i>Planctomycetes</i>	0,9	<b>&lt; 0,01</b>	0,89	<b>&lt; 0,01</b>
<i>Proteobacteria</i>	0,69	<b>0,01</b>	-	-
<i>Verrucomicrobia</i>	0,64	<b>0,02</b>	0,65	<b>0,02</b>



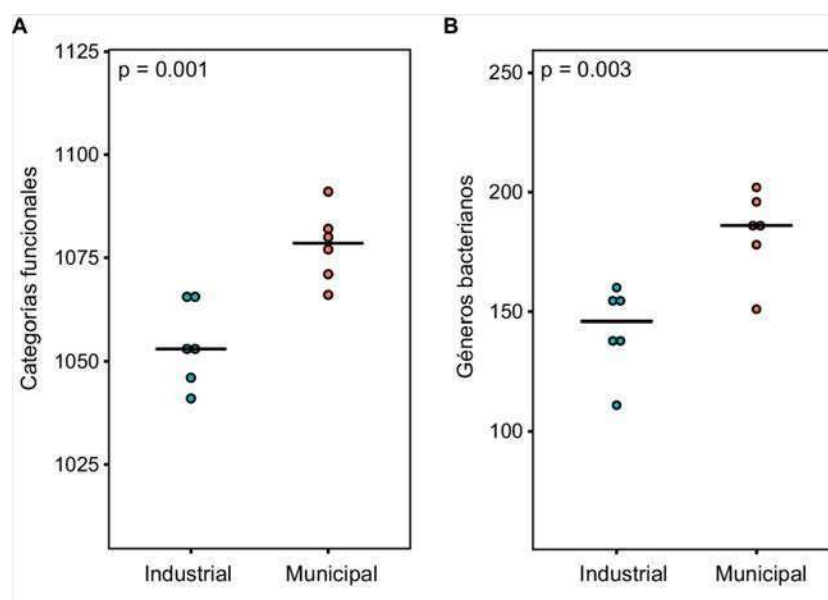
### Riqueza taxonómica y funcional en lodos activados

La distribución de taxones bacterianos determinados a partir de las anotaciones correspondientes a ARNr 16S fue similar a la previamente detectada por medio de pirosecuenciación de amplicones. El filo *Actinobacteria* y el filo candidato TM7 resultaron ser relativamente abundantes en las muestras provenientes de la PTE del procesamiento de suero lácteo, mientras que los filios *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* hicieron lo propio en el lodo de la planta textil. El filo *Acidobacteria* también presentó abundancias destacables en la planta depuradora de la tintorería textil, así como en la PTE de la síntesis de polímeros (PtcB), tal como había sido visto por pirosecuenciación del ARNr 16S. Finalmente, el filo *Firmicutes* fue característico de las plantas que tratan efluente cloacal, y el grupo *Chlorobi* pudo ser asociado a las comunidades microbianas de lodos activados de la industria petroquímica, aunque siempre en baja proporción (Fig. 18A).

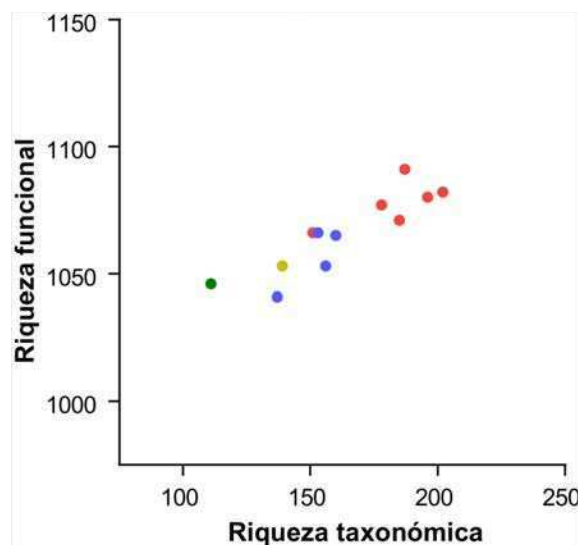


**Figura 18:** Variación de los perfiles (A) taxonómicos y (B) funcionales de las muestras, analizados en base a filios bacterianos (con *Proteobacteria* dividido en clases) y subsistemas SEED (nivel 1), respectivamente.

La riqueza taxonómica de lodos activados municipales, determinada a partir del número de géneros bacterianos observados, fue significativamente mayor que la de los lodos industriales (prueba t de Student,  $p=0,003$ ; Fig. 19A). En sintonía con este resultado, la riqueza funcional exhibida por las comunidades de lodos municipales, medida como el número de subsistemas SEED de nivel 3 detectados, fue más alta que que la de comunidades de lodos industriales (prueba t de Student,  $p=0,001$ ; Fig. 19B). Por otro lado, la riqueza funcional y la riqueza taxonómica determinadas para este conjunto de datos mostraron una correlación positiva significativa (Pearson  $r=0,87$ ;  $p<0,001$ ;  $n=12$ ; Fig. 20).



**Figura 19:** Diversidad bacteriana en lodos activados industriales y municipales. A: Número de subsistemas SEED (nivel 3) representados por muestra; B: Número de géneros bacterianos detectados por muestra a partir de lecturas anotadas como ARNr 16S. Ambos estimadores fueron normalizados, y las réplicas técnicas y las muestras tomadas a diferentes tiempos fueron promediadas. Una prueba t de Student determinó la existencia de diferencias significativas ( $p<0,001$ ).

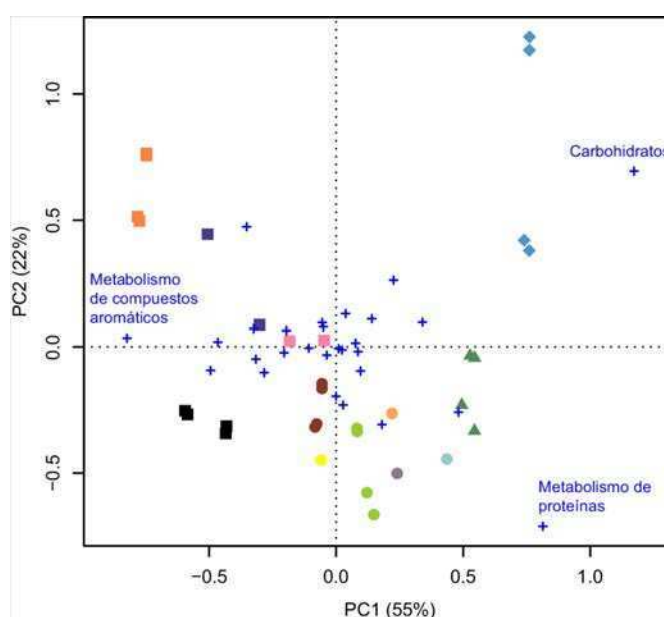


**Figura 20:** Relación entre las medidas de riqueza funcional y taxonómica observadas en 12 comunidades microbianas de lodos activados independientes (rojo: municipal; azul: petroquímica; amarillo: filtración de suero; verde: tintorería textil). La riqueza funcional está representada por el número de subsistemas SEED (nivel 3). La riqueza taxonómica fue estimada por medio de las lecturas identificadas como ARNr 16S y clasificadas en géneros. Las réplicas técnicas y las muestras tomadas a diferentes tiempos fueron promediadas.

### **Perfil de categorías funcionales en lodos activados**

Se investigó si las capacidades funcionales detectadas entre las lecturas de secuenciación al azar podían proveer un poder de discriminación útil para distinguir muestras de lodos activados. Para este fin, se realizó un análisis de componentes principales sobre los valores relativos de abundancia de los subsistemas SEED a nivel 1, el nivel jerárquico superior (Fig. 21). Los dos ejes principales explicaron 55% y 22% de la varianza total, respectivamente. Los miembros de cada par de réplicas técnicas presentaron una alta similitud, lo que indicó que la secuenciación fue reproducible y que la distribución de fragmentos génicos no se vio distorsionada por un muestreo azaroso de secuencias metagenómicas debido a una baja cobertura. Todas las muestras, incluyendo aquellas provenientes de plantas localizadas en India y China, agruparon según el tipo de efluente tratado. Las muestras de PTEs municipales se ubicaron en el centro del diagrama, mientras que las petroquímicas presentaron valores negativos respecto al componente principal 1 (PC1). Los lodos activados de la industria textil y del suero lácteo tomaron la posición opuesta en el diagrama de componentes principales. Los subsistemas de mayor influencia en el ordenamiento fueron el de

'Hidratos de Carbono' y el del 'Metabolismo de Compuestos Aromáticos', los cuales se asociaron principalmente al procesamiento de suero lácteo y a las plantas de la industria petroquímica, respectivamente. La siguiente categoría en importancia fue la del 'Metabolismo de Proteínas', asociada al efluente de suero lácteo en cuanto al primer eje, y a las plantas municipales respecto al segundo eje (Fig. 21).

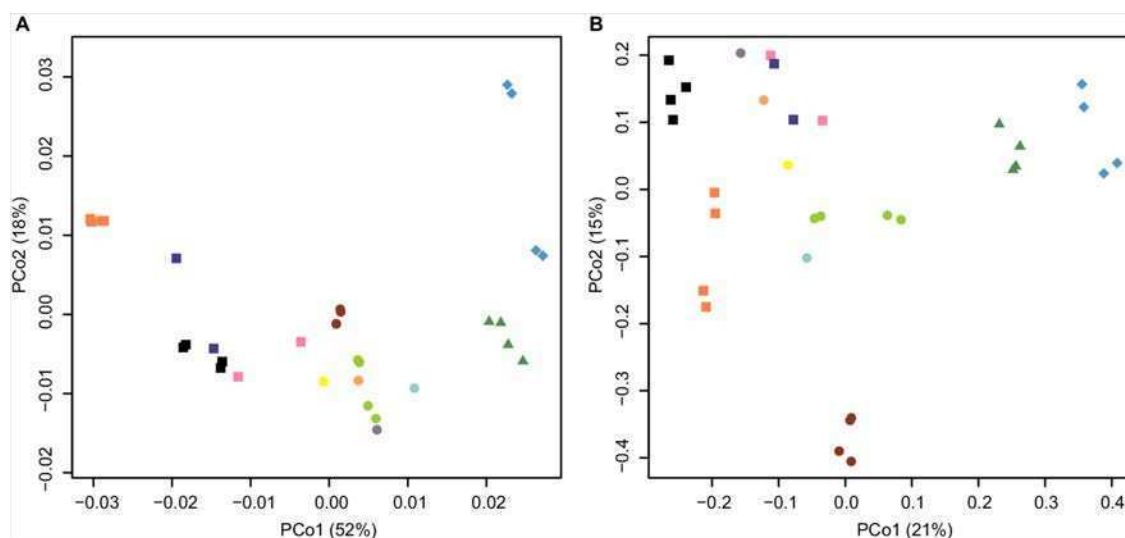


**Figura 21:** PCA en base a proporciones de subsistemas SEED (nivel 1). Las réplicas técnicas y las muestras tomadas a diferentes tiempos fueron incluidas de forma separada. Las muestras se agruparon por muestra puntual (figuras idénticas, en su mayoría superpuestas), y luego de acuerdo a su PTE de origen (colores diferentes) y al tipo de efluente: municipal (círculos), petroquímico (cuadrados), de tintorería textil (triángulos), de procesamiento de suero lácteo (rombos). Las categorías funcionales (cruces azules) fueron rotuladas únicamente cuando  $PC > |0,5|$ .

Con el objetivo de obtener de forma detallada los rasgos funcionales responsables de la separación de las muestras en el ordenamiento, se determinaron los subsistemas SEED a nivel 3 con mayores valores de carga en un Análisis de Componentes Principales y en un Análisis de Correspondencia. Así se pudo encontrar que ciertos genes relacionados al metabolismo de los azúcares, como aquellos vinculados a la 'Incorporación y Utilización de Lactosa y Galactosa', estaban por cierto mayormente representados en los

lodos activados que trataban el efluente del procesamiento de suero lácteo (eje principal 1, valores positivos; Tabla 13), mientras que funciones como la de 'Carboxilasa de acetofenona 1' y la 'Degradación de ácido n-fenilcanoico', ambas constituyentes del metabolismo de compuestos aromáticos, prevalecían en las PTEs de las industrias petroquímicas (eje principal 1 de valores negativos; Tabla 13).

Dentro del conjunto de datos de secuenciación al azar, se pudo observar que los taxones mostraron mayor variación que las funciones (ver Fig. 18A y 18B, respectivamente). Sin embargo, a pesar de presentar menores diferencias, las categorías funcionales fueron capaces de alcanzar una clara discriminación entre muestras que trataban diferentes tipos de efluentes. Un Análisis de Coordenadas Principales mostró que los subsistemas SEED ordenan las muestras de forma similar que los fragmentos de ARNr 16S (Prueba de Mantel para la Correlación de Matrices  $r=0,76$ ;  $p<0,0001$ ). No obstante, los genes funcionales lograron separar todas las muestras municipales de las petroquímicas y presentaron una alta proporción de la varianza en los dos ejes principales (Fig. 22).



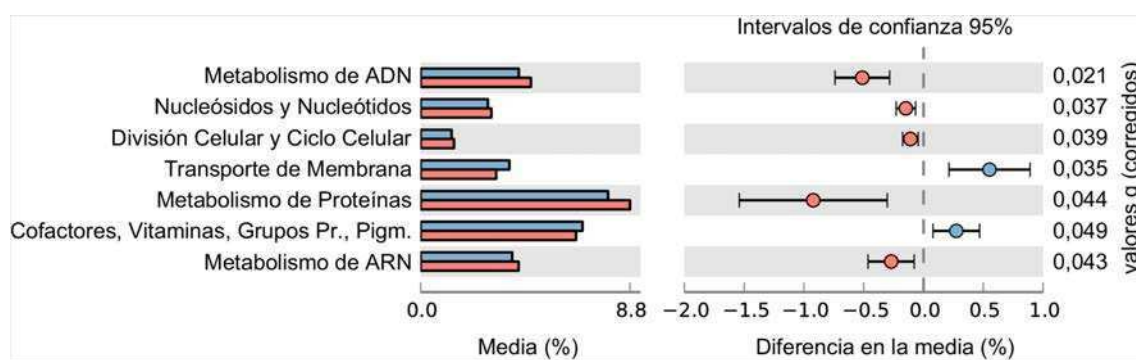
**Figura 22:** Análisis de Coordenadas Principales en base a la matriz de disimilitud Bray-Curtis correspondiente a (A) los subsistemas SEED, nivel 1 y (B) géneros bacterianos identificados a partir de lecturas asignadas como ARNr 16S en plantas municipales (círculos), petroquímicas (cuadrados), textil (triángulos) y de suero lácteo (rombos). Los colores corresponden a las diferentes PTEs. Se incluyeron las réplicas técnicas y las muestras tomadas a diferentes tiempos de forma separada.

**Tabla 13:** Análisis de Correspondencia (CA) y Análisis de Componentes Principales (PCA) basados en subsistemas SEED (nivel 3), con el objetivo de recuperar las categorías más influyentes de los ordenamientos.

<b>Carga relativa, CA1 (37 %)<sup>1</sup></b>	<b>Subsistema</b>
1,000	Sistema de incorporación de hierro mediado por petrobactina
0,802	Utilización de D-alosa
0,796	Sideróforo [Alcaligin-like]
0,768	Biosíntesis de betaína a partir de glicina
0,763	Sideróforo enterobactina
0,743	Locus de invasión de Salmonella
0,726	Hidrogenasa (ferredoxina) de conservación de energía
0,660	Hidrogenasas unidas a membrana
0,655	Hidrogenasas de Archaea unidas a membrana
0,648	Operón catabólico (GlcNAc) <sub>2</sub>
-1,000	Fimbria alfa
-0,849	Operón de hemolisina de Streptococcus agalactiae
-0,849	Cluster Fago Ea
-0,817	Archeasa
-0,764	Inhibidor de lisozima
-0,741	Cluster 2 tipo PFGI-1
-0,734	Cluster 1 tipo PFGI-1
-0,680	Carboxilasa de acetofenona 1
-0,644	Biosíntesis de adhesina de biofilm
-0,637	Monooxigenasa micobacteriana
<b>Carga relativa, PCA1 (52 %)<sup>1</sup></b>	<b>Subsistema</b>
1,000	Utilización de azúcar en Thermotogales
0,349	COG3533
0,332	GTPasas universales
0,267	Utilización de maltosa y maltodextrina
0,264	Incorporación y utilización de lactosa y galactosa
0,255	Utilización de D-galactorunato y D-glucuronato
0,254	Ciclo de ATC
0,216	Factores bacterianos de traducción y elongación
0,212	Metabolismo de galactosilceramida y sulfogalactosilceramida
0,212	Metabolismo de ADN
-1,000	Regulones para la degradación de ácidos grasos
-0,852	Cluster de metabolismo de ácidos grasos
-0,849	Degradación de ácido n-fenilalcanoico
-0,767	Fermentación de acetyl-CoA a butirato
-0,704	Metabolismo de PHB
-0,670	Degradación de isoleucina
-0,653	Transportador ABC aminoácidos de cadena ramificada (TC 3,A,1,4,1)
-0,568	Biosíntesis de biotina
-0,549	Biosíntesis de butanol
-0,495	Flagelo

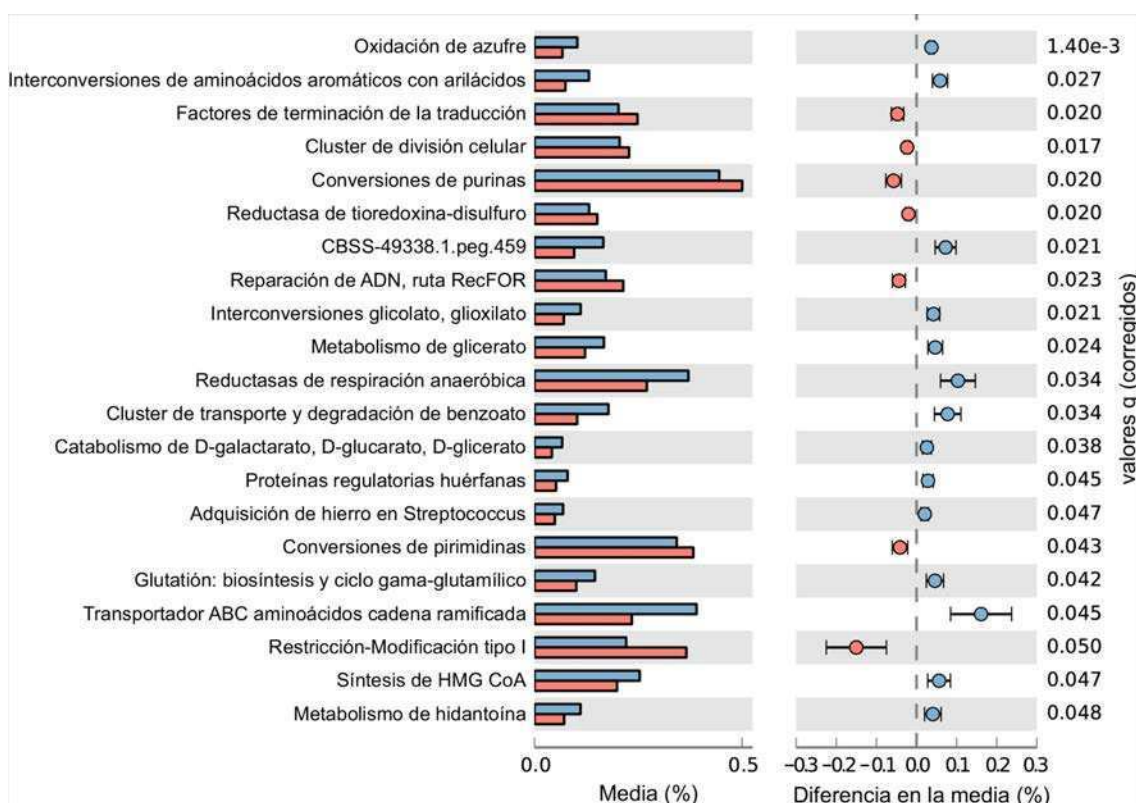
1: Entre paréntesis, proporción de la varianza explicada por el eje principal.

Finalmente se puso el foco en las categorías funcionales de muestras de lodos activados de plantas depuradoras municipales y petroquímicas, cuyas diferencias fueron analizadas estadísticamente (n=6 y n=4, respectivamente). El nivel 1 de los subsistemas SEED presentó siete categorías con diferencias significativas. La mayor diferenciación por parte de las municipales se dio en anotaciones relacionadas con el metabolismo de nucleótidos y de proteínas, mientras que las muestras petroquímicas mostraron estar enriquecidas en genes asociados al transporte de membrana (Fig. 23).



**Figura 23:** Comparación de las proporciones de categorías funcionales entre metagenomas de lodos activados petroquímicos (barras azules, n=4) y municipales (barras rojas, n=6). Se utilizaron los subsistemas SEED (nivel 1) con valores de abundancia relativa mayores a 0,5%; las réplicas técnicas y muestras tomadas a diferentes tiempos fueron promediadas.

A nivel 3, un nivel jerárquico más detallado, se encontraron 21 categorías que presentaban diferencias significativas. Catorce de ellas caracterizaban a las muestras petroquímicas, incluyendo genes relacionados al metabolismo de azufre y al transporte y la degradación del benzoato. Las otras siete categorías, vinculadas a diversas funciones generales de la célula y del metabolismo de nucleótidos, contaban con mayor representación entre las muestras municipales (Fig. 24).



**Figura 24:** Comparación de las proporciones de categorías funcionales entre metagenomas de lodos activados petroquímicos (barras azules, n=4) y municipales (barras rojas, n=6) con diferencias significativas (prueba t de Student con corrección Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas;  $p < 0,05$ ; tamaño de efecto  $> 0,02$ ). Se utilizaron los subsistemas SEED (nivel 3) con valores de abundancia relativa mayores a 0,01%. Las réplicas técnicas y las muestras tomadas a tiempos diferentes fueron promediadas.

En el tratamiento de efluentes, las variables ambientales y de operación afectan de manera apreciable el funcionamiento del proceso. Con el objetivo de analizar si las mismas se asocian a los perfiles funcionales de las comunidades microbianas presentes en lodos activados, se llevó a cabo una prueba de ajuste no paramétrica sobre el ordenamiento de los subsistemas de máxima jerarquía (Tabla 14). En base a 1000 permutaciones, la única variable que presentó una asociación positiva significativa fue la del oxígeno disuelto (OD), un parámetro con valores más altos en la planta vinculada al efluente de la síntesis de polímeros acrílicos.



**Tabla 14:** Prueba de ajuste para cinco variables de operación (oxígeno disuelto (OD); pH; sólidos suspendidos (SS); temperatura (T); tiempo de retención de sólidos (TRS)) sobre el análisis de componentes principales, realizado con valores de abundancia relativa de subsistemas (nivel 1) de las seis PTEs locales. Los valores p fueron generados en base a 1000 permutaciones.

	PC1	PC2	r <sup>2</sup>	Pr(>r)	
OD	-0,914	0,406	0,815	0,002	p<0,01
pH	0,987	-0,159	0,420	0,080	p<0,1
SS	0,900	0,436	0,430	0,075	p<0,1
T	-0,623	-0,783	0,117	0,562	-
TRS	-0,905	0,426	0,210	0,347	-

### **Validación a través del ensamblado de lecturas metagenómicas**

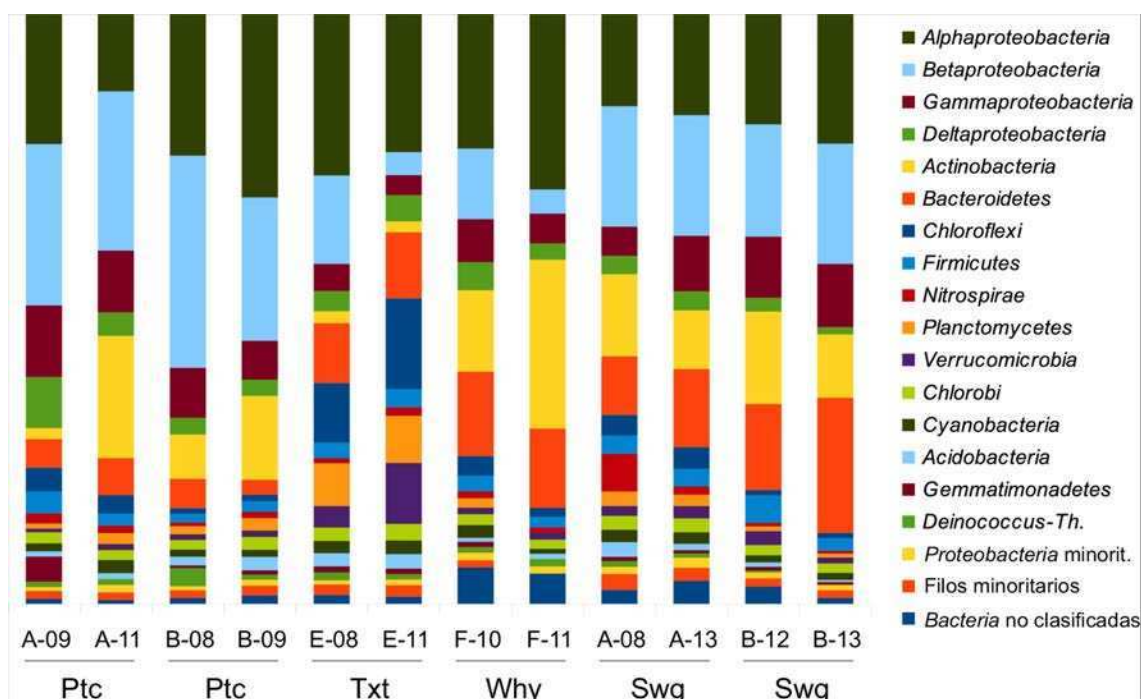
Con el propósito de obtener una anotación más confiable, que permita validar las diferencias funcionales (y taxonómicas) observadas entre comunidades de lodos activados, se procedió a ensamblar las lecturas metagenómicas de cada muestra. Sólo se ensamblaron las muestras provenientes de Argentina (ver Materiales y Métodos para más detalles). Las características generales de los ensamblados se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15:** Características básicas del conjunto de datos correspondiente a las muestras metagenómicas ensambladas.

Muestra	Nro. <i>Scaffolds</i>	Tamaño (pb)	N50	Largo máximo
PtcA-09	14.274	8,23 x 10 <sup>7</sup>	15.173	7,95 x 10 <sup>5</sup>
PtcA-11	21.049	8,64 x 10 <sup>7</sup>	6.637	3,00 x 10 <sup>5</sup>
PtcB-08	13.623	1,00 x 10 <sup>8</sup>	26.631	7,58 x 10 <sup>5</sup>
PtcB-09	8.279	5,18 x 10 <sup>7</sup>	15.732	3,90 x 10 <sup>5</sup>
Txt-08	15.650	4,89 x 10 <sup>7</sup>	26.050	3,42 x 10 <sup>5</sup>
Txt-11	5.638	4,98 x 10 <sup>7</sup>	23.796	4,14 x 10 <sup>5</sup>
Why-10	16.963	1,07 x 10 <sup>8</sup>	15.122	1,28 x 10 <sup>6</sup>
Why-11	2.081	2,88 x 10 <sup>7</sup>	46.109	2,97 x 10 <sup>5</sup>
SwgA-08	54.503	1,31 x 10 <sup>8</sup>	2.673	2,39 x 10 <sup>5</sup>
SwgA-13	29.333	6,05 x 10 <sup>7</sup>	2.084	1,89 x 10 <sup>5</sup>
SwgB-12	70.382	1,47 x 10 <sup>8</sup>	2.099	2,39 x 10 <sup>5</sup>
SwgB-13	37.479	7,84 x 10 <sup>7</sup>	2.212	4,75 x 10 <sup>4</sup>

El análisis de lecturas ensambladas en MG-RAST permitió, en primer lugar, verificar la presencia destacada de los grupos bacterianos característicos en las diferentes plantas

(Fig. 25). Se confirmó la preferencia de los grupos *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* por el ambiente de la tintorería textil, acompañados por los filos *Chloroflexi* y *Acidobacteria*, este último compartido con una de las muestras petroquímicas (PtcB). En el caso de la depuradora de la refinería de petróleo (PtcA), fue posible identificar nuevamente a uno de sus filos minoritarios, *Gemmatimonadetes* (ver Fig. 9, clase *Gemmatimonadetes*). En los lodos activados vinculados al suero lácteo (Why) se destacaron los filos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, así como un nutrido grupo de asignaciones no clasificadas, lo que podría estar relacionado con el filo TM7, detectado en la primera parte de este trabajo por pirosecuenciación de amplicones. Las muestras municipales exhibieron su perfil característico, en tanto que en una de ellas, SwgA, sobresalió el filo *Nitrospirae*.



**Figura 25:** Distribución taxonómica en base a lecturas metagenómicas ensambladas. La asignación fue realizada por MG-RAST contra la base de datos M5nr. Los valores de abundancia relativa fueron transformados por raíz cuadrada para permitir la visualización de grupos minoritarios.

En cuanto al potencial fenotípico, el foco fue puesto en las muestras que presentaron mayores diferencias respecto a la variable PC1 obtenida en base a información funcional de lecturas no ensambladas (ver Fig. 21, PCA) y se las consideró como dos grupos: 'PC1 > 0' (las petroquímicas, PtcA y PtcB) y 'PC1 < 0' (tintorería textil y suero lácteo, Txt y Why). Por un método sencillo basado en cocientes de abundancias

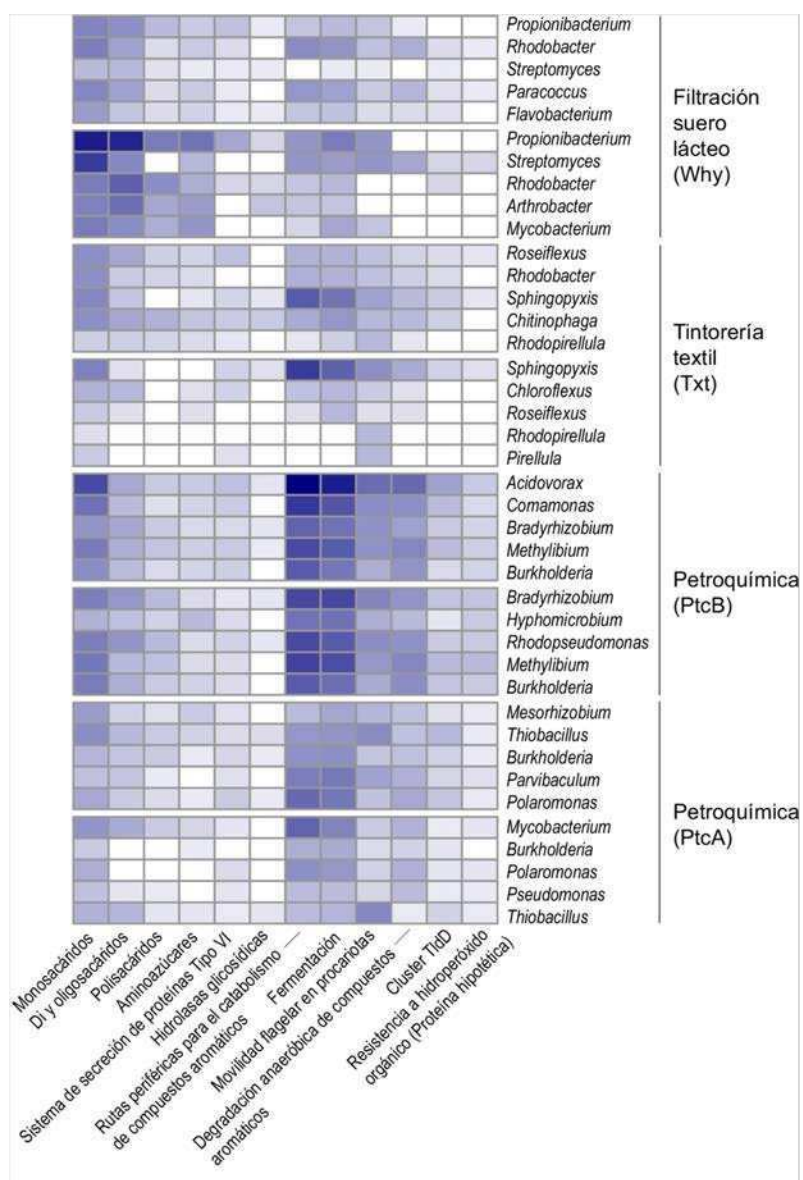
relativas, se buscaron los subsistemas que estuvieran más representados en uno y en otro grupo (Tabla 16). Como las más relevantes dentro de 'PC1 > 0' – que contiene las muestras que tratan el efluente de la filtración de suero lácteo y el de la tintorería textil, efluentes ricos en hidratos de carbono (ver Fig. 4B) – se confirmaron ciertas funciones agrupadas dentro de categorías que corresponden al metabolismo de hidratos de carbono, como 'monosacáridos', 'di y oligosacáridos', 'polisacáridos' y 'hidrolasas glicosídicas'. Asimismo, categorías vinculadas al metabolismo de compuestos aromáticos, como 'Rutas periféricas para el catabolismo de compuestos aromáticos' o 'Degradación anaeróbica de compuestos aromáticos', distinguieron nuevamente a las comunidades de plantas petroquímicas.

**Tabla 16:** Valores de abundancia de los subsistemas a nivel 2 en base a las anotaciones correspondientes a lecturas ensambladas. 'PC1 > 0' y 'PC1 < 0' representan grupos de PTEs con los más altos valores para la variable PC1. Aquí se presentan los 20 subsistemas más influyentes, determinados en base al cociente de los valores de abundancia relativa entre los dos grupos.

Subsistemas – Nivel 2	PC1>0 (Why+Txt)	PC1<0 (PtcA+PtcB)
Proteína hipotética - Resistencia a hidroperóxido orgánico	0,03	<b>0,06</b>
Rutas periféricas para el catabolismo de compuestos aromáticos	0,84	<b>1,76</b>
Biotina	0,45	<b>0,88</b>
Utilización de putrescina/GABA	0,09	<b>0,16</b>
Degradación anaeróbica de compuestos aromáticos	0,24	<b>0,44</b>
Cluster TldD	0,09	<b>0,17</b>
Proteínas de membrana hipotéticas - Ybbk	0,04	<b>0,07</b>
Transportadores ABC	0,60	<b>0,99</b>
Fermentación	0,95	<b>1,56</b>
Movilidad flagelar en procariontas	0,74	<b>1,17</b>
Subsistemas – Nivel 2	PC1>0 (Why+Txt)	PC1<0 (PtcA+PtcB)
Sideróforos	<b>0,10</b>	0,04
Agente de Transferencia Génica	<b>0,12</b>	0,05
Sistema de fosfotransferasas de azúcar	<b>0,09</b>	0,04
Oxidoreductasa de molibdopterina	<b>0,11</b>	0,05
Aminoazúcares	<b>0,39</b>	0,17
Di y oligosacáridos	<b>1,45</b>	0,65
Monosacáridos	<b>2,15</b>	1,02
Sistemas de secreción de proteínas, Tipo VI	<b>0,31</b>	0,15
Polisacáridos	<b>0,58</b>	0,29
Hidrolasas glicosídicas	<b>0,08</b>	0,04

Por último, con la intención de indagar sobre la asociación entre taxones y funciones, se dirigió la atención a los 5 géneros mayoritarios para cada muestra de los grupos 'PC1 > 0' y 'PC1 < 0', y se identificaron coincidencias entre sus *contigs* y los de las 6 categorías

funcionales que más distinguían a las diferentes plantas de tratamiento. Los géneros dominantes del grupo petroquímico estaban enriquecidos en aquellos subsistemas que caracterizan a sus comunidades bacterianas (Fig. 26). El efecto no es tan claro para las categorías de 'PC1 > 0', en especial si se toma a las muestras de la tintorería textil, aunque sí es distinguible en lodos activados que tratan el efluente del suero lácteo.

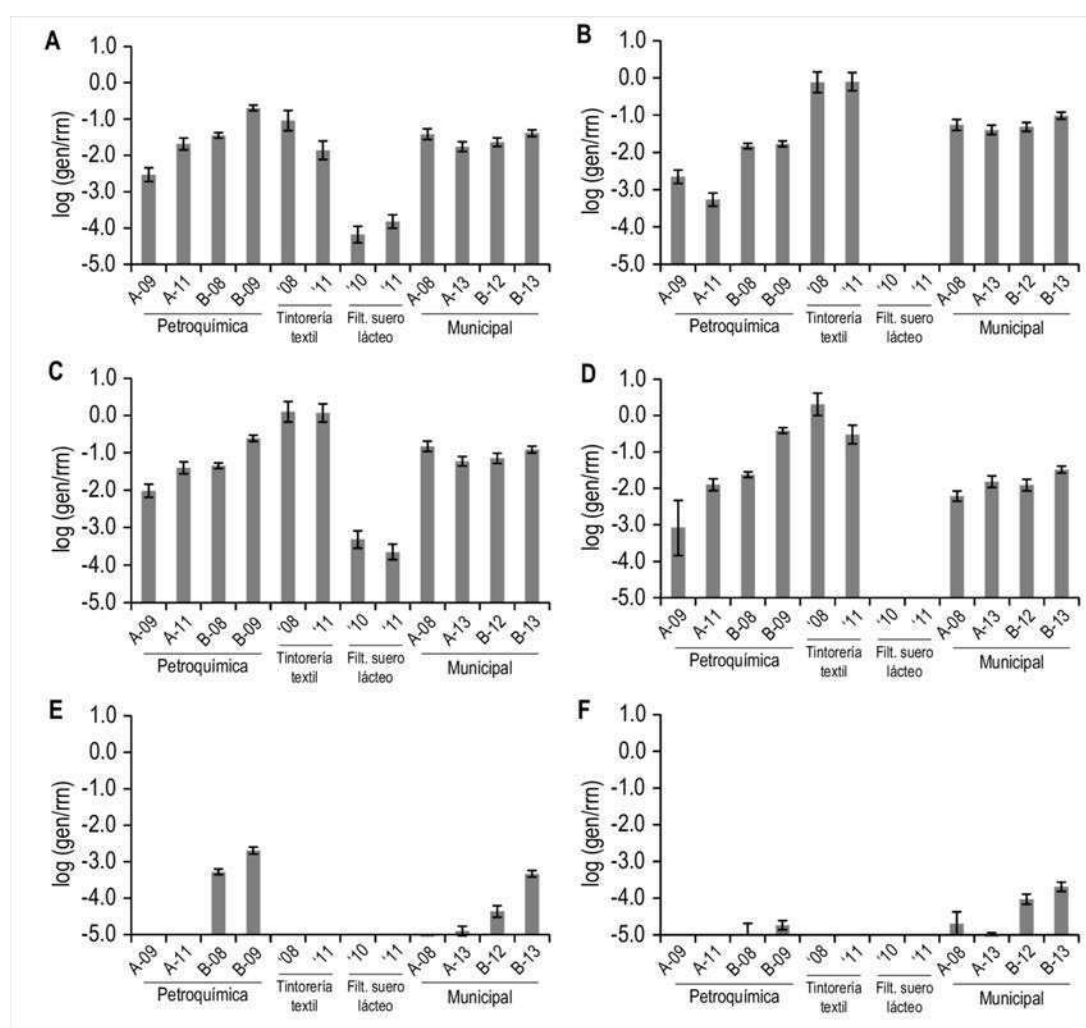


**Figura 26:** Subsistemas (nivel 2) distintivos, vinculados a los cinco géneros más abundantes de cada muestra, en base a las anotaciones de lecturas metagenómicas ensambladas.

#### 4. ANÁLISIS DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

##### Integrones y plásmidos de amplio rango de hospedadores

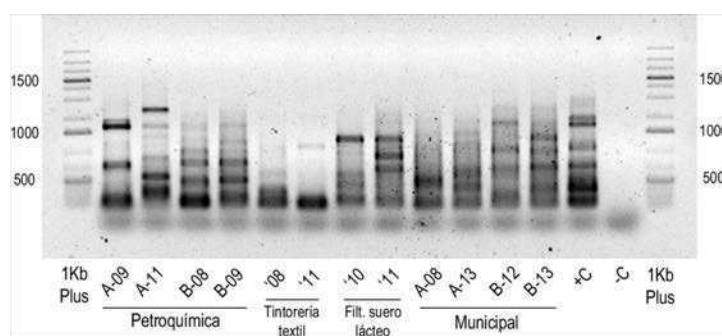
Se realizaron ensayos de PCR cuantitativa con cebadores y sondas fluorescentes específicas para componentes de seis genes vinculados a elementos móviles del genoma en cada muestra de las seis plantas de tratamiento de efluentes de Argentina. Las muestras de una misma planta tomadas a diferentes tiempos exhibieron valores relativamente similares a lo largo de los seis ensayos. Es decir, o bien presentaron en general valores dentro del mismo orden de magnitud, o bien superaron el límite de detección en oposición a otras plantas (Fig. 27).



**Figura 27:** Ensayos de PCR cuantitativa para seis EGMs, con valores relativos al número de copias de ADNr 16S (rm). (A) *intI1*; (B) *qacE-qacEΔI*; (C) *sull1*; (D) *korB*; (E) *trfA*; (F) *intI2*.

De esta manera fue posible determinar diferencias entre plantas de tratamiento. Las plantas municipales fueron las únicas que presentaron valores detectables para todos los ensayos realizados, inclusive en el caso de los elementos menos frecuentes, *trfA* (IncP-1ε) e *intl2* (integrones de clase 2). Dentro de las muestras de lodos activados industriales, aquellas vinculadas al tratamiento de suero lácteo fueron las que presentaron menores valores a nivel general, mientras que la comunidad de la planta de la tintorería textil se comportó de manera opuesta. No obstante, es posible que los valores reportados para los lodos activados de la planta textil estén afectados por el sesgo que presentan los cebadores correspondientes al gen de ARNr 16S, los cuales excluyen (al menos en forma parcial) al filo *Planctomycetes* (Suzuki et al., 2000), de alta abundancia en dicha comunidad de lodos activados. Por último, las muestras de lodos activados de la industria petroquímica son las que presentaron mayor variación intra- e inter-planta, con valores similares o menores a las plantas de tratamiento de efluentes municipales (Fig. 27).

### Arreglos de *cassettes* génicos en integrones de clase 1



**Figura 28:** Distribución de arreglos de *cassettes* génicos contenidos en integrones de clase 1, en diferentes muestras de lodos activados. '+C' consiste en una muestra adicional de lodos activados de origen industrial. '-C' es el blanco de la reacción de amplificación.

La amplificación de pequeños arreglos de *cassettes* ubicados en integrones de clase 1, analizada por electroforesis en gel de agarosa, mostró efectivamente la presencia de componentes génicos ubicados entre las zonas conservadas, que debieron ser incorporados mediante la acción de la integrasa (Fig. 28). El número de arreglos observado fue relativamente bajo en todos los casos (3-6) y no presentó una marcada variación entre muestras, salvo en el caso de la tintorería textil (<3). Las muestras derivadas de un mismo sistema de tratamiento presentaron, en la mayoría de los casos, una coincidencia parcial en el patrón de bandas. La planta que trata el efluente proveniente de la síntesis de polímeros acrílicos (PtcB), por ejemplo, exhibió entre 3 y 4 bandas de entre 400 y 1000 pb a alturas congruentes, mientras que las muestras de la refinería (PtcA), tan sólo coinciden en una banda mayor a 1000 pb. La muestra de lodos activados asociados al efluente de la filtración de suero lácteo exhibió una diversidad considerable, más allá de los bajos valores determinados por PCR cuantitativa. Una banda cercana a los 1000 pb se presentó como una característica compartida. Las muestras vinculadas a la tintorería textil, en cambio, presentaron arreglos con un número escaso o pobre de componentes génicos.

# Discusión

Los organismos procariotas han sido denominados “la mayoría invisible” (Whitman et al., 1998). En forma de comunidades microbianas auto-organizadas y auto-sostenidas, se encuentran a lo largo y a lo ancho de la biósfera, llevando a cabo funciones vitales en ecosistemas naturales y artificiales. Estudiar su estructura, su potencial fenotípico, su función y sus interacciones, así como su respuesta frente a perturbaciones, es la tarea central de la ecología microbiana, cuyos aportes representan a su vez un enorme interés para la biotecnología ambiental (Rittmann et al., 2006).

En esta tesis se han estudiado la diversidad taxonómica y el potencial fenotípico en sistemas de tratamiento de efluentes, con especial énfasis en lodos activados que tratan efluentes industriales y en sus diferencias con los lodos activados que tratan efluentes cloacales, con el objetivo de desentrañar factores clave en el ensamblado de las comunidades bacterianas sobre las que sustentan su funcionamiento. Se ha encontrado que los sistemas de lodos activados industriales no comparten el perfil característico de rangos taxonómicos altos que ha sido observado en plantas distribuidas geográficamente, de tratamiento de efluentes municipales. Por el contrario, los barros activados industriales exhibieron comunidades bacterianas singulares, y características para cada PTE. Asimismo, estas diferencias de estructura de las comunidades bacterianas entre las PTEs fueron consistentes con diferencias subyacentes en los valores de abundancia de categorías funcionales particulares. Por otro lado, el contenido de GC metagenómico en las comunidades presentó perfiles conservados para una misma PTE, y de una alta congruencia entre PTEs que reciben aguas residuales de origen similar. Estos resultados colocan como un factor determinante en el ensamblado de la comunidad bacteriana el tipo de efluente que ingresa a la planta de tratamiento.

## **Diversidad taxonómica**

En un trabajo pionero dentro de la ecología microbiana basada en secuenciación masiva, von Mering y colaboradores cuantificaron la diversidad filogenética microbiana en cuatro tipos de hábitats dispares: suelo agrícola, superficie marina, drenaje ácido de una



mina, y huesos de ballena en el mar profundo (von Mering et al., 2007). En este trabajo se determinó que algunos clados microbianos presentaban una preferencia por hábitats específicos, y aún más, una preferencia estable a lo largo del tiempo, sugiriendo un proceso de ensamblado de las comunidades microbianas de fuerte carácter selectivo.

Las preferencias de ciertos grupos por nichos específicos también se ha detectado a nivel de órdenes dentro de una de las clases bacterianas más diversas, *Alfaproteobacteria* (Ettema y Andersson, 2009). Más aún, no es necesario extremar las diferencias entre hábitats. Manejos agrícolas determinados y diversas coberturas en el suelo (Jangid et al., 2008), o un gradiente de impacto ganadero por pastoreo en un mismo suelo (Philippot et al., 2009), pueden ser suficientes para ocasionar cambios en las comunidades microbianas a niveles taxonómicos altos. En su conjunto, estas observaciones son consistentes con el concepto de coherencia ecológica de grupos bacterianos a rangos taxonómicos mayores al de especie. Si linajes enteros fueron moldeados a lo largo de la evolución, su efecto debe trascender los niveles de cepas y especies para poder ser vislumbrados en rangos taxonómicos altos, revelando su importancia ecológica (Philippot et al., 2010).

Estudios previos realizados en plantas de tratamiento de efluentes a escala real y a escala de laboratorio indicaban que las comunidades bacterianas de lodos activados estaban dominadas por los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Snaidr et al., 1997; Wagner y Loy, 2002; Eschenhagen et al., 2003; Yang et al., 2011). Recientemente, numerosos censos masivos basados en el gen de ARNr 16S llevados a cabo en diferentes partes del mundo, confirmaron los resultados de aquellos primeros análisis (Hu et al., 2012; Valentín-Vargas et al., 2012; Wang et al., 2012). Sin embargo, ninguno de ellos resaltaba la similitud aparente de la distribución bacteriana de la mayoría de las PTEs a altos niveles taxonómicos, a pesar del amplio rango geográfico y de configuraciones de reactor.

La formación de un *floc* biológico con la capacidad de sedimentar es una propiedad ecológica característica de los lodos activados. En consecuencia, y de acuerdo con la noción de coherencia ecológica, uno podría haber anticipado que la distribución de filos y clases observada en plantas municipales de tratamiento biológico, de variadas configuraciones y ubicaciones geográficas, se mantendría en lodos activados vinculados al tratamiento de efluentes industriales, los cuales se basan en el mismo principio de

sedimentación. Sin embargo, este patrón no fue hallado. Al contrario, los resultados de esta tesis revelaron el contraste que existe entre las comunidades de lodos activados municipales y diferentes lodos industriales. La composición bacteriana de muestras provenientes de una pequeña planta de tratamiento que recibe efluente doméstico en Argentina, y los datos publicados de cinco plantas municipales ubicadas en Singapur, China y Corea del Sur (Wang et al., 2012; Zhang et al., 2012; B.-C. Kim et al., 2013) exhibieron distribuciones relativamente compartidas, aún a pesar de tratarse de múltiples laboratorios con diferencias en los métodos de extracción de ADN y en la región del ARNr 16S secuenciada. Por otro lado, las plantas de tratamiento industrial presentaron perfiles taxonómicos característicos de acuerdo a su origen, que las diferenciaron entre sí y de las plantas municipales en los sucesivos análisis de agrupamiento y de ordenamiento. Para cada planta de tratamiento se detectaron taxones de alto rango de una manera reproducible, aún tratándose de muestras separadas por casi tres años, sugiriendo que cada planta posee una comunidad relativamente característica y estable. La estabilidad temporal podría relacionarse con la existencia de un estado de equilibrio para la comunidad microbiana, para la cual las perturbaciones, la estocasticidad y las dinámicas temporales de organismos individuales generan cambio, para luego retornar hacia el punto estable o atractor (Walker et al., 2004).

A nivel de género, nivel al que es esperable una relevancia mayor de la distribución biogeográfica, se observaron diferencias considerables en el porcentaje clasificado entre muestras, y cierta incertidumbre de agrupamiento (bajos valores de *bootstrap*), lo que se suma a la influencia ejercida por la región del gen de ARNr 16S elegida para enmascarar detalles de la estructura a este nivel taxonómico (Kumar et al., 2011).

Las tablas de distribución de abundancia marcan una preferencia distintiva de ciertos grupos bacterianos por PTEs particulares. La planta de tratamiento de la tintorería textil se caracterizó por abundancias considerables de *Planctomycetes*, *Lentisphaera* y secuencias relacionadas a *Chlamydiae*, tres filos pertenecientes al grupo monofilético conocido como superfilo PVC (Wagner y Horn, 2006). El filo *Planctomycetes* posee una distribución amplia y ya había sido detectado en las diferentes secciones de un sistema de tratamiento de efluentes municipales (Chouari et al., 2003). *Lentisphaera* es un filo pobremente caracterizado y ha sido relacionado a la degradación de lignocelulosa y/o la conversión de productos lignocelulíticos dentro de un consorcio

anaeróbico mesofílico (Yan et al., 2012). En el mismo sentido, se han hallado grupos relacionados a *Chlamydiae* formando parte de un consorcio adaptado al crecimiento sobre pasto varilla (*Panicum virgatum*) como única fuente de carbono (DeAngelis et al., 2010). La relación con un efluente de tintorería textil podría estar dada por la capacidad que poseen las enzimas degradadoras de lignina de procesar una amplia variedad de colorantes azoicos, heterocíclicos y poliméricos (Nyanhongo et al., 2002). El filo *Chlamydiae* es en realidad conocido por sus miembros que parasitan células eucariotas, aunque diferentes reportes indican que existe una diversidad adicional en el ambiente (Horn y Wagner, 2001). La exploración de estos grupos de bacterias poco estudiados podría aportar novedades genéticas con alto potencial biotecnológico, más aún en este caso, al tratarse de una comunidad adaptada a un pH alcalino.

Otro grupo distinguido fue el filo TM7, de alta abundancia en muestras de barros activados vinculados al procesamiento de suero lácteo y a la elaboración de alimento balanceado. Esto es consistente con reportes previos que han descrito a miembros de este filo como organismos especialistas en la hidrólisis de proteínas, lo que los ubicaría como piezas centrales en procesos de alta tasa de degradación de proteínas en plantas de lodos activados (Xia et al., 2007).

Las PTEs que tratan efluentes de procesos petroquímicos (refinería de petróleo y polímeros acrílicos) fueron las únicas que presentaron secuencias clasificadas como filo *Chlorobi*. Ya que los miembros conocidos de este grupo son fotoautotróficos obligados, en realidad podría tratarse de una asignación equivocada, o bien de un grupo filogenéticamente emparentado, característico en ciertos ambientes ricos en hidrocarburos. Al respecto, es interesante notar que un trabajo de Abbai y colaboradores (Abbai et al., 2012) ya había detectado secuencias de ADN asignadas a *Chlorobi* dentro del metagenoma de agua subterránea contaminada con hidrocarburos. Por otro lado, la planta de tratamiento de polímeros acrílicos exhibió una alta proporción de *Acidobacteria*. Ya fue asociado al filo con el tratamiento de efluentes petroquímicos (Figueroa y Erijman, 2007; Wei et al., 2015). Como miembro importante en comunidades microbianas de suelos, este filo ha presentado cierta ubicuidad en sistemas de tratamiento de efluentes, aunque poco se sabe hasta el momento de su función.

Las dos muestras de lodos activados vinculadas a la elaboración de alimento balanceado analizadas en este trabajo no coincidieron en la estructura de su comunidad.

Posiblemente esto se deba a las marcadas diferencias en las características de la materia prima y en los procesos de producción aplicados, pero la falta de información al respecto impide extraer cualquier conclusión respecto a la divergencia observada.

Con un perfil de taxones dominantes característicos en la mayoría de las muestras, no fue posible hallar un grupo común de poblaciones dominantes entre sistemas industriales y municipales. Contrariamente, los resultados indican que hay una consistencia mayor en la composición de la comunidad bacteriana de PTEs municipales distantes que entre sistemas de lodos activados de áreas próximas que tratan efluentes diferentes (Saunders et al., 2016), sugiriendo que el sustrato, es decir, el tipo de efluente a tratar, sería el factor determinante en el ensamblado de las comunidades bacterianas. Al parecer, ya sea en digestores aeróbicos o anaeróbicos, a escala de laboratorio o a gran escala (McHugh et al., 2003; Akarsubasi et al., 2005; Lozada et al., 2006; Riviere et al., 2009; Addison et al., 2011; Zhang et al., 2014), las comunidades de ecosistemas artificiales diseñados para el tratamiento de residuos reflejan con claridad, por un lado, los resultados de procesos evolutivos que moldearon linajes microbianos enteros, determinando especializaciones y adaptaciones para ambientes y sustratos particulares (Philippot et al., 2010), y por el otro, los procesos ecológicos asociados a las múltiples interacciones entre microorganismos, entre las que se encuentra la utilización sintrófica de sustratos como contaminantes orgánicos e inorgánicos (Tolker-Nielsen y Molin, 2000; Freilich et al., 2011; Ju, Xia, et al., 2014; Embree et al., 2015). Además, estudios en ambientes como el intestino, la filósfera y la rizósfera sugieren que el sustrato (dieta en el caso del intestino, exudados en el caso de la filósfera y la rizósfera) también es un factor de relevancia en ecosistemas naturales (Ley et al., 2008; Berg y Smalla, 2009; Redford et al., 2010; Yatsunencko et al., 2012).

Los resultados de esta tesis sugieren que la estructura de la comunidad bacteriana en lodos activados es influenciada, en mayor medida, por el tipo de efluente más que por las distancias geográficas o las condiciones operacionales y ambientales. Las mediciones preliminares de tres grupos generales de compuestos orgánicos (hidratos de carbono, proteínas y ácidos grasos volátiles) aquí presentadas, sumadas a la caracterización general de los diferentes efluentes industriales en base a los procesos productivos informados, sugieren que existe una diferencia pronunciada en la composición química de los efluentes que reciben las distintas PTE. Quedará para

futuras investigaciones la inclusión de un número aún mayor de plantas de tratamiento industriales, en las que pueda realizarse una caracterización fisicoquímica exhaustiva del efluente entrante, lo que permitirá una asociación más precisa entre la estructura de la comunidad, su potencial fenotípico y su función. Esta tarea no es sencilla, ya que los efluentes son siempre una mezcla compleja y fluctuante de múltiples compuestos orgánicos e inorgánicos (Henze, 1992), lo que requeriría la realización de múltiples ensayos de cromatografía y espectrometría de masa para obtener representatividad y altos niveles de resolución (Dignac et al., 2000; Trenholm et al., 2008; Gonsior et al., 2011).

### **Diversidad en el potencial fenotípico y el contenido de GC**

Esta tesis ha mostrado también que las diferencias de la estructura de comunidades bacterianas entre las PTEs coinciden con diferencias subyacentes en la abundancia de conjuntos de categorías funcionales diferenciales, así como con perfiles de contenido de GC característicos. En este sentido, se podría afirmar que la secuenciación metagenómica al azar complementa al análisis basado en taxones en la tarea de discriminar diferentes comunidades microbianas involucradas en el tratamiento de efluentes.

Las muestras analizadas por secuenciación al azar, incluyendo aquellas generadas en laboratorios de India y China, exhibieron perfiles de contenido de GC conservados en una escala temporal de años, y mostraron alta congruencia entre PTEs que reciben líquido residual similar. Es decir, fue posible distinguir con claridad todos los activados que tratan efluentes no relacionados según su contenido de GC. El hecho de que el porcentaje de GC de metagenomas de ambientes diversos varíe ya había sido reportado con anterioridad, vinculado en primera instancia a la distribución particular que exhiben los diferentes filos microbianos, que a su vez presentan genomas de amplia variación en la proporción de guanosina y citosina (entre 15 y 75%, aproximadamente) (Sueoka, 1962; Bentley y Parkhill, 2004; Nakabachi et al., 2006). No obstante, un meta-análisis reciente ilustró la existencia de cambios a lo largo de numerosos hábitats que exceden la estructura filogenética de las comunidades, un cambio detectable aún en múltiples muestras de un mismo ambiente (estudio transversal en el intestino humano). En este

estudio, la estrecha distribución observada discrepaba con la distribución esperada en base a la filogenia previamente censada (Foerstner et al., 2005). Recientemente, Reichenberger y colaboradores ratificaron y ampliaron dicho hallazgo en un trabajo con un volumen mayor de datos (Reichenberger et al., 2015), en el que además comprobaron que tan sólo sutiles diferencias ambientales podían ser suficientes para originar una variación detectable en el contenido de GC. Estos estudios sugieren que aquello que influye sobre la composición nucleotídica lo hace en todos los taxones por igual, aunque los mecanismos subyacentes no han podido ser definidos (Reichenberger et al., 2015). Se considera que en su distribución intervienen procesos neutrales asociados a propiedades intrínsecas de la maquinaria celular, así como procesos de selección relacionados con características fisicoquímicas y factores ecológicos, o una combinación de ambos (Dick et al., 2009).

Existen antecedentes al uso de la metagenómica para detectar diferencias en el potencial funcional de otros tipos de ecosistemas microbianos. Lamendella y colaboradores identificaron elementos funcionales únicos que permitían diferenciar las comunidades microbianas del intestino del cerdo de las de otros animales, como vacas, gallinas y peces (Lamendella et al., 2011). También se reportaron diferencias entre ambientes separados del cuerpo humano, en donde ciertas rutas metabólicas de baja representación surgían de manera notable sólo en sitios particulares del cuerpo (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Por último, un análisis metagenómico por secuenciación al azar sobre la comunidad microbiana de un suelo permanentemente congelado (*permafrost*) en proceso de descongelamiento, permitió la detección de variaciones de genes funcionales en breves lapsos de tiempo (Mackelprang et al., 2011). En este trabajo mostramos que las comunidades de lodos activados presentaron perfiles distintivos en cuanto al potencial fenotípico. En todas las PTE analizadas, las variaciones de estos perfiles fueron menores que las variaciones entre las distribuciones de taxones (ver Fig. 18). Un resultado similar había sido observado en un trabajo de metagenómica comparativa en múltiples hábitats del cuerpo humano (The Human Microbiome Project Consortium, 2012) y en dos trabajos de microarreglos de genes funcionales, en los que Wen y colaboradores analizaron comunidades microbianas de lodos activados de PTEs municipales en Pekín (Wang et al., 2014) y en Guaundong, China (Xia et al., 2014). En principio, condice con la existencia de un cuantioso número

de genes esenciales en la función celular (y comunitaria), involucrados en rutas metabólicas compartidas, junto con el hecho de que agrupar genes en categorías funcionales amplias puede encubrir diferencias finas entre funciones presentes en metagenomas. Sin embargo, a pesar de que la magnitud de las diferencias entre PTEs fue menor a nivel de categorías funcionales que a nivel taxonómico, las primeras alcanzaron un alto grado de discriminación entre metagenomas de lodos activados de diferente origen, agrupando réplicas técnicas y biológicas, y separando muestras de acuerdo al tipo de efluente.

Por medio de una comparación estadística entre metagenomas de lodos municipales y de plantas de tratamiento petroquímicas, en esta tesis se observó que los primeros estaban enriquecidos en genes relacionados al metabolismo de nucleótidos y proteínas, lo que podría indicar la capacidad característica de las bacterias de una PTE municipal de procesar continuamente una amplia variedad de productos biológicos. Entre ellos, se reportó que las proteínas aportan la mitad de la fracción orgánica en efluentes municipales promedio (Ellis, 2004). En cuanto a las muestras petroquímicas, su enriquecimiento en genes asociados con el transporte de membranas podría reflejar el hecho de que el pasaje de sustratos hidrofóbicos a través de la membrana celular es un primer paso necesario en la biodegradación de hidrocarburos (Hearn et al., 2008).

La asignación taxonómica y funcional de lecturas metagenómicas cortas (<200 pb, tecnología Illumina), especialmente aquellas provenientes de muestras ambientales, es una tarea delicada y su precisión puede ser cuestionada (McHardy et al., 2007; Wommack et al., 2008; Mande et al., 2012), a pesar de la existencia de herramientas de análisis apropiadas para secuencias de esa longitud (Thomas et al., 2012; Truong et al., 2015). No obstante, para evitar sesgos derivados de deficiencias en la anotación, en este trabajo se llevó a cabo una validación a través del ensamblado de las lecturas metagenómicas. El procedimiento realizado arrojó conjuntos de *scaffolds* con características básicas de calidad comparable a otros estudios (Albertsen et al., 2013; Mao et al., 2014) (ver Tabla 15), con tamaños del orden de las decenas de Mpb. Las categorías funcionales que habían sido determinantes utilizando el conjunto de lecturas no ensambladas fueron confirmadas al analizar las anotaciones de lecturas ensambladas. Sin embargo, para el conjunto ensamblado no se hizo hincapié en valores de abundancia ni se calcularon índices ecológicos, ya que se consideró que el proceso mismo de

ensamblado podría producir un desvío en los valores iniciales de abundancia iniciales que se detectan a partir de lecturas no ensambladas (Meyer et al., 2008).

En esta tesis, la secuenciación masiva de ADN metagenómico al azar fue utilizada para exponer el potencial funcional presente en las comunidades complejas de microorganismos en lodos activados. Este paso inicial puede ser complementado en el futuro con perfiles de ARN, de proteínas y de metabolitos para superar el carácter predictivo (o de potencial fenotípico) de la misma (Segata et al., 2013; Mason et al., 2014). En un estudio en el intestino humano, por ejemplo, se ha determinado una expresión de proteínas relacionadas al metabolismo de hidratos de carbono mayor que la predicha por datos de ADN metagenómico (Verberkmoes et al., 2009). En lodos activados industriales, en donde suelen ocurrir descargas de altas concentraciones a lo largo de la operación, es posible que también existan períodos de fuertes discrepancias entre el potencial fenotípico y los perfiles de expresión. No obstante, el hecho de que estos perfiles no genómicos sean altamente variables en el tiempo (la expresión de ciertos genes se da en condiciones específicas), exige múltiples ensayos 'ómicos' por sitio (aquí, por planta de tratamiento) para alcanzar muestras moleculares representativas.

El diseño experimental y los resultados de esta tesis han colocado el foco en la selección ecológica ejercida por las variables ambientales de las plantas de tratamiento, en particular, por la composición del efluente a tratar. El nexo entre el efluente y el ensamblado de la comunidad está probablemente dado por una fina partición de nichos dentro de la matriz ecosistémica (Kindaichi et al., 2013). Sin embargo, no se descarta la influencia de los otros mecanismos que moldean el ensamblado de las comunidades de organismos: diversificación *in situ*, dispersión y deriva ecológica. Gracias a la dispersión, existe un aporte constante de componentes microbiológicos a la comunidad microbiana (Ofiteru et al., 2010; Ayarza y Erijman, 2011), aunque su efecto más evidente se da durante el inicio del funcionamiento de planta. El rol que juega la diversificación, por su parte, ha quedado relegado en sistemas de tratamiento y requiere otro tipo de enfoque, uno que no se ocupe de medir la diversidad sino que estudie las relaciones filogenéticas en base a genes conservados y no conservados, así como la variación generada por la transferencia genética horizontal (Ochman et al., 2000; Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004; Gómez y Buckling, 2013).



### **Elementos genéticos móviles en lodos activados**

En comunidades microbianas ambientales, el moviloma exhibe una vasta diversidad de componentes (Smalla y Sobecky, 2002). Sin embargo, la forma en que se estructura, así como la influencia que tienen la filogenia y el ambiente sobre su composición, son aspectos que, en gran medida, escapan al conocimiento actual (Wright et al., 2008). Tanto el sistema de cassettes génicos en integrones como los plásmidos IncP-1 han sido detectados en aguas residuales y en lodos activados, aunque típicamente en plantas de tratamiento de efluentes municipales (Bahl et al., 2009; Moura et al., 2010; Parsley et al., 2010; Ma et al., 2013). El análisis presentado en esta tesis representa parte de una exploración incipiente de su distribución en comunidades de lodos activados industriales (Moura et al., 2010). La consistencia hallada en la cuantificación de EGMS a lo largo de las diferentes PTEs, así como en el análisis del perfil de *cassettes* en integrones de clase 1, sugiere que los mismos factores que determinan el ensamblado de la comunidad microbiana de lodos activados podrían estar afectando su conjunto de EGMS.

La detección de los componentes de integrones de clase 1 y de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP-1 en la mayor parte de las muestras de lodos activados coincide con su reciente asociación con sitios contaminados (Wright et al., 2008; Koenig et al., 2009; Gillings et al., 2015). Las razones de su presencia no están del todo esclarecidas, pero estarían vinculadas a procesos de selección, ya sea del integrón *per se* o de sus *cassettes*, así como a procesos de coselección (Wright et al., 2008). Los integrones de clase 2, por su lado, presentaron niveles de abundancia bajos, y una preferencia por las plantas de efluentes municipales, lo que posiblemente esté relacionado con su estrecho vínculo con bacterias fecales (Mokracka et al., 2012). A futuro será importante ampliar el espectro filogenético cubierto por los cebadores y sondas utilizadas, hecho especialmente relevante en comunidades con menor representación del filo *Proteobacteria*, como aquellas de las plantas de la tintorería textil y de la procesadora de suero lácteo (Wright et al., 2008).

El ensayo de PCR para la detección de arreglos de *cassettes* no es óptimo para arreglos de gran tamaño, y es poco probable que se trate de arreglos multigénicos. Sin embargo, los perfiles obtenidos guardan coherencia con lo que se observó al amplificar *cassettes* individuales (300-1500 pb) en un amplio espectro de ambientes (Stokes et al., 2001). La

asociación de funciones con los marcos abiertos de lectura (ORFs) contenidos en *cassettes* se dificulta por la aún poco explorada diversidad, su consecuente baja proporción de anotación, y la presencia de secuencias que no codifican proteínas (Holmes et al., 2003; Michael et al., 2004). No obstante, develar si los genes asociados confieren capacidades de degradación (Koenig et al., 2009; Dealtry et al., 2014)(Dealtry et al., 2014; Koenig et al. 2009), de resistencias a metales y/o a antibióticos (Baker-Austin et al., 2006), o de cualquier otra función que sea asociable al tipo de efluente es un próximo paso obligado.

### **Riqueza de taxones y categorías funcionales**

Se sabe que la riqueza microbiana puede ser influenciada fuertemente por la diversidad de sustratos carbonados (Zhou et al., 2002). Debido a la variedad de hábitos urbanos, es de esperar que el efluente cloacal contenga un rango más amplio de constituyentes químicos en comparación con el agua residual industrial, lo que podría generar un mayor número de nichos disponibles. En este sentido, este trabajo detectó una riqueza taxonómica y funcional significativamente mayor en lodos activados municipales en comparación con los lodos industriales. La observación respecto a la riqueza taxonómica vale tanto para los datos de secuenciación de amplicones como para aquellos derivados de la secuenciación al azar. Es interesante notar que un estudio que comparó las microbiotas intestinales de poblaciones humanas distanciadas geográfica y culturalmente de manera notable, también remarcó diferencias significativas en la riqueza taxonómica del microbioma del intestino. Particularmente, aquellas poblaciones con dietas más ricas en fibras vegetales, presentaron los mayores valores de riqueza (Yatsunenکو et al., 2012). La relación entre la disponibilidad de recursos (y su heterogeneidad) y la diversidad biológica es una temática cubierta por numerosos trabajos y establecida como parte de la teoría ecológica (Spehn et al., 2000; De Deyn y Van Der Putten, 2005). Sin embargo, es válido preguntarse si para el sistema de lodos activados no existen otros factores que afecten la riqueza taxonómica y funcional, como el régimen de operación (con tiempos de retención mayores) (Akarsubasi et al., 2009), o más aún, el considerable ingreso de constituyentes microbianos de la materia fecal (McLellan et al., 2010). Se ha determinado que las comunidades bacterianas del agua residual de ingreso difieren considerablemente de las comunidades de lodos activados,

aunque un número reducido de OTUs logran perdurar en la comunidad bacteriana de lodos activados (Saunders et al., 2016). No sólo se trata de organismos microbianos que podrían llegar a establecerse dentro de la comunidad, sino que además están las condiciones dadas para un intercambio de elementos genéticos novedosos. En este sentido, el material genético vinculado a resistencias a antibióticos ha sido lo más estudiado (Luczkiewicz et al., 2010; Yang et al., 2014), aunque no se puede descartar un flujo genético mayor.

Hipotéticamente, se podría haber dado el caso de detectar una mayor diversidad taxonómica en ausencia de una mayor diversidad de categorías funcionales, o viceversa. En esta tesis, las cuantificaciones pertinentes en comunidades de lodos activados permitieron determinar que una mayor riqueza taxonómica refleja una mayor riqueza funcional. En base a un análisis metagenómico con lecturas provenientes de mRNA y de amplicones de ARNr 16S de 10 PTEs a gran escala en Suiza, Johnson y colaboradores (Johnson et al., 2014) también reportaron una asociación positiva entre el número de taxones bacterianos y el número de categorías funcionales, argumentando que el resultado estaba de acuerdo con la predicción de la teoría ecológica: las comunidades de mayor riqueza abarcan un mayor rango de funciones (Chapin et al., 1997). Comunidades microbianas de suelos y de intestinos han exhibido patrones similares (Fierer et al., 2012; The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Yatsunenko et al., 2012).

Sin embargo, las conclusiones derivadas del conjunto de datos aquí presentado deberían ser tomadas con cierta cautela, ya que por la variación en la composición de la comunidad en lodos activados de diferentes PTEs combinada con la representación desigual de taxones en las bases de datos utilizadas para anotación a gran escala, se podría derivar en estimaciones de riqueza sesgada (Franzosa et al., 2015). Además, se debe considerar que la detección de ADN no equivale necesariamente a organismos activos, por lo que es conveniente realizar una validación (Saunders et al., 2016).

La relación entre diversidad microbiana y estabilidad del ecosistema es una pregunta central en ecología y en biotecnología ambiental (Briones y Raskin, 2003; Girvan et al., 2005; Lozupone et al., 2012). En este sentido, los sistemas de tratamiento de efluentes se posicionan como un modelo de estudio muy pertinente para este campo de investigación (Curtis y Sloan, 2004; Miura et al., 2007), en donde se puede abordar la

temática desde la respuesta de la comunidad frente a una perturbación (Fernandez et al., 2000; Allison y Martiny, 2008; Vuono et al., 2015), o desde la dinámica propia de la comunidad con un mantenimiento de la estabilidad funcional (Kaewpipat y Grady, 2002). Cualquiera sea el caso, se considera que hay dos conceptos principales e interconectados que los atraviesan. Uno es el de la redundancia funcional, definida como la habilidad de un taxón microbiano para llevar a cabo un proceso a la misma tasa que otro en condiciones ambientales idénticas, y el otro es el de la similitud funcional, bajo la cual dos comunidades microbianas realizan un proceso funcional a una tasa similar, sin importar las diferencias en la composición taxonómica (Allison y Martiny, 2008). El número de especies en un determinado sistema es considerado un aspecto crucial para su resiliencia. Se sabe que comunidades ricas en especies son menos susceptibles a invasiones porque utilizan los recursos limitantes de una manera más eficiente (Levine y Antonio, 1999), y porque existe una mayor probabilidad de redundancia funcional, que podría permitir el reemplazo de taxones afectados por una perturbación ambiental por otros con igual capacidad funcional. Si ante perturbaciones la función del ecosistema (aquí, *performance* del proceso) es mantenida por la redundancia y la similitud funcional, el objetivo de la operación debería ser maximizar la diversidad. Diversos trabajos en sistemas biotecnológicos microbianos han reportado asociaciones positivas entre la diversidad y la estabilidad (Cook et al., 2006; Miura et al., 2007; Werner et al., 2011). No obstante, se llegó al consenso debido a la existencia de resultados heterogéneos (Pholchan et al., 2010). Al día de hoy, no se ha podido trazar una línea directa que conecte la diversidad bacteriana con el funcionamiento global. Es necesario ahondar en la temática si se quiere alcanzar la eficiencia energética y una reutilización de recursos sin perder la estabilidad funcional del sistema (Botton et al., 2006).

### **Variables de operación y la estructura de la comunidad microbiana**

El rol del sustrato en el ensamblado de comunidades microbianas de sistemas biológicos de tratamiento de residuos parece ser determinante, prevaleciendo por sobre otras variables de operación. Sin embargo, es posible que al resto de las variables se les pueda atribuir un papel de regulación fina sobre la comunidad, con una relevancia no despreciable a lo largo del proceso de tratamiento. La relación que guardan la

configuración y la operación del reactor con el ensamblado de la comunidad bacteriana y su función ha sido siempre un tema de gran interés en biotecnología ambiental (Tomita et al., 2002). Estudios basados en patrones moleculares o en secuenciación masiva se propusieron establecer qué parámetros operacionales y ambientales podían estar influyendo sobre la estructura de la comunidad microbiana en lodos activados municipales. En ellos se puso de manifiesto que la DBO y el oxígeno disuelto (T.-S. Kim et al., 2013), la DQO de ingreso y el pH (Gao et al., 2016), así como la configuración del reactor (Rowan et al., 2003; Pholchan et al., 2010) pueden ser factores relevantes en la estructuración de la comunidad a bajos niveles taxonómicos. En esta tesis, los parámetros que presentaron una asociación significativa fueron el oxígeno disuelto y el pH, presentándose como factores que podrían explicar hasta cierto punto la composición bacteriana en barros activados. Hubo dos PTEs, principalmente, que explicaron este resultado, las cuales presentaban una diferencia marcada con respecto al resto, junto con perfiles de ARNr 16S y categorías funcionales también característicos.

El oxígeno disuelto se define como el oxígeno gaseoso disuelto en un determinado volumen de agua a determinadas temperatura y presión atmosférica. Un estudio basado en un muestreo de un año presentó una correlación negativa del oxígeno disuelto con *Nitrospira*, y positiva con *Nitrobacter*, dos géneros oxidantes de nitrito (Huang et al., 2010), mientras que en otro estudio, múltiples eventos de deficiencia de oxígeno fueron vinculados al crecimiento de especies filamentosas (Gaval y Pernelle, 2003). Por otro lado, Wells y colaboradores determinaron que el oxígeno disuelto (entre otras variables de operación) se asociaba positivamente con la estructura de una comunidad bacteriana de lodos activados, también a lo largo de un año (Wells et al., 2011). Es sabido que la deficiencia de oxígeno puede generar un impacto sobre la comunidad presente en lodos activados, con consecuencias visibles en el plazo de unos pocos días. Sin embargo, el caso distintivo presentado aquí, en la fábrica de síntesis de polímeros acrílicos, consta de una planta que operaba a muy alta concentración de oxígeno disuelto (~8 mg/l), una situación poco frecuente y pocas veces estudiada. Chapman y colaboradores determinaron tiempo atrás que las concentraciones altas de oxígeno disuelto (~6 mg/l) mejoraban la *performance* del proceso, al promover una mayor remoción de materia orgánica y sólidos en suspensión ante un rango de F/M más amplio, presentar un lodo de rápida sedimentación, y producir menor cantidad de WAS (lodo secundario purgado).

Su hipótesis era que la mayor penetración de oxígeno dentro del *floc* mantenía números altos de organismos viables en el sistema (Chapman et al., 1976), aunque se sabe que los micro-nichos anóxicos pueden albergar parte de la diversidad en lodos activados (De Beer et al., 1998). Otro trabajo relacionó la operación a bajo y a alto oxígeno disuelto con la estructura biológica y fisicoquímica de la comunidad microbiana en reactores tipo MBR. Sus resultados exhibieron claras diferencias en cuanto a la composición de géneros bacterianos dominantes, ya sea en la fracción líquida como en la fracción adherida, y también en cuanto a la producción y composición de exopolisacáridos (EPS) (Yoon Kim et al., 2006). Del ensayo de pirosecuenciación de amplicones de ARNr 16S llevada a cabo en esta tesis no se logró diferenciar el efecto del oxígeno disuelto del originado por la composición del efluente. Sin embargo, la complementación brindada por la secuenciación al azar expuso el potencial fenotípico diferencial asociado a sustratos particulares. Para probar que los altos valores de oxígeno disuelto afectan a la comunidad microbiana será necesario contar o con un mayor número de PTEs, o bien con un ensayo especialmente diseñado. El proceso de aireación en un sistema de lodos activados representa el costo energético más alto, por lo que es importante mantener el OD dentro del rango óptimo, de entre 2 y 3 mg/l, a menos que se compruebe una utilidad en operar por ciertos lapsos de tiempo a altas concentraciones de oxígeno disuelto, por ejemplo, para limitar el crecimiento de microorganismos perjudiciales (Rossetti et al., 1994).

En cuanto al pH, no hay duda de que es un factor selectivo categórico, hecho fácilmente reconocible en ambientes con pH extremos, donde solamente prosperan poblaciones adaptadas (Macalady et al., 2004; Sorokin, 2005). Asimismo, su efecto en comunidades microbianas del suelo es ampliamente aceptado (Nicol et al., 2008; Rousk et al., 2010), y hasta fue propuesto como un parámetro con capacidad de predecir la estructura de las comunidades bacterianas en suelo a escala continental (Lauber et al., 2009). En sistemas de tratamiento de efluentes es una variable que se controla de forma obligada, siendo 6-9 el rango adecuado para procesos biológicos. Las plantas municipales trabajan con un licor mezcla de valores cercanos a 7, mientras que los efluentes industriales pueden presentar valores más dispares, por lo que se les aplica, en caso necesario, pretratamientos neutralizantes. Según unos pocos reportes, la variación dentro del rango funcional 6-9 puede ser causa de cambios en la comunidad microbiana de los lodos

activados (Chua et al., 2003; Zhang et al., 2005). Por otro lado, estudios en otros ambientes revelaron diferentes mecanismos de adaptación, entre los que se hallan un elevado número de transportadores para retener protones, alta producción de ácidos, y superficies celulares especiales (Padan et al., 2005; Krulwich et al., 2009). El pH de la PTE de la tintorería textil supera en condiciones normales al resto de las plantas analizadas, con valores cercanos a 8,5. Sin llegar a representar una comunidad de extremófilos, el perfil taxonómico particular y la consistente detección de lecturas asignadas a detoxificadores de cationes de múltiples subunidades podría estar relacionada al pH característico y a una alta salinidad (*multi-subunit cation antiporter*; datos no presentados). Sería interesante verificar si existe una relación entre dichas lecturas y los grupos taxonómicos poco frecuentes en lodos activados, como los diferentes miembros del superfilo PVC, así como también estudiar la presencia y el funcionamiento de enzimas catabólicas adaptadas a un pH alcalino (van den Burg, 2003).

Los sistemas analizados en este trabajo no presentaron temperaturas particularmente altas, y es posible que por ello que no se hallara una asociación de este parámetro con la distribución taxonómica o el potencial fenotípico de las comunidades de lodos activados. No obstante, la temperatura es considerada otra variable relevante para los sistemas microbianos en general, más allá de que las plantas de lodos activados funcionan de manera robusta en un rango relativamente amplio. En PTEs municipales el efecto de la temperatura tiene menor impacto, ya que la variación de la temperatura es gradual y de baja amplitud, y está vinculada a las estaciones del año, mientras que las PTEs industriales pueden llegar a tratar efluentes de altas temperaturas, al punto tal de requerir torres de enfriamiento previo al tratamiento biológico (Ng y Tjan, 2006). Wells y colaboradores encontraron que la temperatura presentaba una correlación con la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de un año. Sin embargo, la temporalidad asociada a la variación de la temperatura durante los doce meses surgía como un factor de confusión (Wells et al., 2011).

Tampoco se halló una asociación entre los perfiles de las comunidades bacterianas y el tiempo de retención de sólidos (TRS), un parámetro central del diseño y en la operación. La experiencia en tratamiento de efluentes muestra que la estabilidad funcional aumenta con un incremento en el SRT (Curtis et al., 2003), lo que no condice necesariamente con

un aumento de la diversidad bacteriana (Hallin et al., 2005; Saikaly et al., 2005), para la cual la disparidad de resultados hace suponer que la intervención de procesos ecológicos estocásticos pueda estar enmascarando su influencia (Akarsubasi et al., 2009).

En último lugar, se observó que la distribución de las PTEs en los análisis de ordenamiento podría ser compatible con un gradiente de biodegradabilidad de la fracción orgánica contenida en el agua residual entrante. Lamentablemente, no se contaba con este tipo de datos para el período cercano al muestreo. Sin embargo, utilizando datos puntuales del cociente DBO/DQO como un estimador de la biodegradabilidad, se puede apreciar un perfil creciente desde el efluente de la tintorería textil y de la síntesis de polímeros acrílicos hacia los componentes del agua residual de la ultrafiltración de suero lácteo.

### **Implicancias en la operación**

Los hallazgos de este trabajo podrían tener implicancias en el diseño y la operación de sistemas de lodos activados industriales. En primer lugar, existen modelos mecanicísticos para representar los procesos biológicos que ocurren en reactores biológicos, como el ASM1 o ASM3, que son críticos para el diseño y la evaluación del proceso de lodos activados (Hauduc et al., 2013). Para que su aplicación en la optimización del proceso sea exitosa, la calibración de los modelos requiere determinaciones experimentales en relación a la estequiometría y la cinética del proceso, obtenidas de la PTEs a gran escala en estudio (Sin et al., 2005). En este sentido, se utiliza comúnmente la respirometría para la caracterización experimental del agua residual así como de la biomasa heterotrófica activa, un componente significativo del modelo (Hauduc et al., 2013). Para el diseño de nuevas plantas se utilizan típicamente parámetros ya establecidos para casos municipales (Insel et al., 2012). A la hora de utilizar los modelos ASM para el tratamiento biológico de desechos industriales, los ingenieros responsables del diseño suelen estar al tanto de las diferencias en la composición química entre efluentes industriales y cloacales, especialmente por la mayor incidencia de inhibidores presentes en los primeros (Boursier et al., 2004; Stricker y Racault, 2005; Ubay Cokgör et al., 2009). Sin embargo, no sucede lo mismo con las diferencias en la composición de poblaciones heterotróficas que crecen



aeróbicamente y son responsables de la remoción de la DBO tanto en plantas de tratamiento de efluentes municipales como de industriales. En base a la presente tesis, se sugiere que los perfiles particulares de la composición microbiana de la biomasa de lodos activados municipales e industriales podrían verse reflejados en variaciones en la cinética de consumo de sustrato y de formación de productos de almacenamiento.

En segundo lugar, el hecho de que el efluente sea un determinante clave en la definición de la estructura de la comunidad de lodos activados, podría abrir la posibilidad de utilizar diferentes efluentes como herramientas moduladoras ante los desajustes que puedan ocurrir por la acción de grupos bacterianos presentes en las plantas de tratamiento (Nielsen et al., 2009). El cambio en la estructura de la comunidad microbiana ante variaciones en los sustratos degradables ya se comprobó en otros sistemas (Turnbaugh et al., 2008; Hazen et al., 2010), pero aún no fue practicada de forma activa en lodos activados. A pesar del desempeño estable que caracteriza al sistema, el mismo no deja de estar fundamentado en la acción de una compleja comunidad biológica, lo que puede ser causante de fallas y de un mal funcionamiento. El excesivo crecimiento de bacterias filamentosas, por ejemplo, puede ser causante del efecto de abultamiento del lodo, más conocido por su término anglosajón *bulking*. El *bulking* filamentoso disminuye la compactación y sedimentación del barro, y el resultado es la descarga de sólidos en el efluente tratado (Martins et al., 2004). Otros inconvenientes pueden estar dados por espumas biológicas de difícil disgregación que cubren el reactor biológico (Pujol et al., 1991), o por el crecimiento bacteriano disperso en vez del crecimiento agregado, lo que se manifiesta en un efluente turbio y por ende de baja calidad (Ng y Tjan, 2006). Actualmente existen numerosos parques industriales en Argentina, los cuales cuentan con diversas actividades industriales representadas. Sus efluentes crudos son tratados por separado, a veces enfrentándose a problemas de operación vinculados a la interacción del sistema biológico con las variables ambientales del proceso. Los parques industriales podrían ser escenarios propicios para poner a prueba esta hipótesis, unificando la red de efluentes de forma controlada, de manera tal que sea factible realizar perturbaciones (de menor o mayor intensidad) en comunidades microbianas que se hayan desplazado a estados que no permitan una depuración efectiva.

En tercer y último lugar, este trabajo se puede ubicar dentro de los límites de un clásico

debate sobre la relación entre diversidad, estabilidad y función (McCann, 2000), vigente desde hace décadas en ecología de plantas y animales y, recientemente, de microorganismos. Estos últimos se han incorporado especialmente en relación a los procesos de biotecnología ambiental, como el tratamiento de efluentes o la generación de biogas. Sin embargo, el conocimiento sobre esta relación en sistemas de comunidades microbianas complejas aún es incipiente (Wagner y Loy, 2002). El trabajo más categórico en este sentido, realizado sobre comunidades microbianas de digestores anaeróbicos que trataban efluentes de cervecería (Werner et al., 2011), mostró que un aumento de la diversidad alfa (en particular, la equitatividad) se asociaba a una mayor actividad metanogénica, mientras que el incremento de la diversidad beta (aquí, variación temporal) presentaba una correlación con una mayor tasa de remoción de materia orgánica. Favorecería el desempeño del tratamiento promover altos valores de diversidad en este tipo de sistemas si se encontraran asociaciones similares o análogas. En esta tesis se sugirió que la diversidad de compuestos químicos presentes en efluentes municipales sería el factor subyacente a los mayores valores de riqueza taxonómica y funcional detectados en los correspondientes lodos activados respecto a los sistemas industriales. Por lo tanto, es posible especular que la unificación de efluentes crudos en parques industriales – incluida su fracción cloacal – en un solo efluente de mayor complejidad química y biológica, sería favorable. Se necesitaría una única planta de tratamiento, posiblemente reduciendo costos de infraestructura y personal, en donde posiblemente se promovería el ensamblado de una comunidad microbiana más diversa, robusta y funcional.

## Comentarios finales

En conclusión, en esta tesis se muestra que el efluente entrante es un factor decisivo en el delineamiento de la conformación comunitaria/metagenómica en lodos activados. Estos hallazgos son particularmente interesantes, dado que las plantas de tratamiento de efluentes estudiadas variaban en configuración y operación, y que los datos metagenómicos que se incluyeron fueron obtenidos en laboratorios distintos y secuenciados bajo condiciones similares pero no idénticas. Este trabajo resalta la sensibilidad de la secuenciación metagenómica comparativa para alcanzar un alto grado de discriminación de consorcios microbianos complejos de funciones relacionadas en procesos de biotecnología ambiental. Ahora bien, a futuro, es importante persistir en el aislamiento en cultivo (Zengler et al., 2002), en el ensamblado de genomas a partir de datos metagenómicos (Albertsen et al., 2013), así como en la vinculación de organismos, genes y funciones (Wagner et al., 2006), para luego “organizar, analizar, comprender y utilizar los datos con propósitos predictivos, de diseño y de operación” (de los Reyes III et al., 2015). De esta forma, es posible que en el corto a mediano plazo se alcance un mayor grado de comprensión acerca de la relación entre estructura y función, y una explotación más eficiente y racional de múltiples procesos biotecnológicos.

# Apéndice

## ANÁLISIS DEL SESGO POR AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL

### Materiales y Métodos

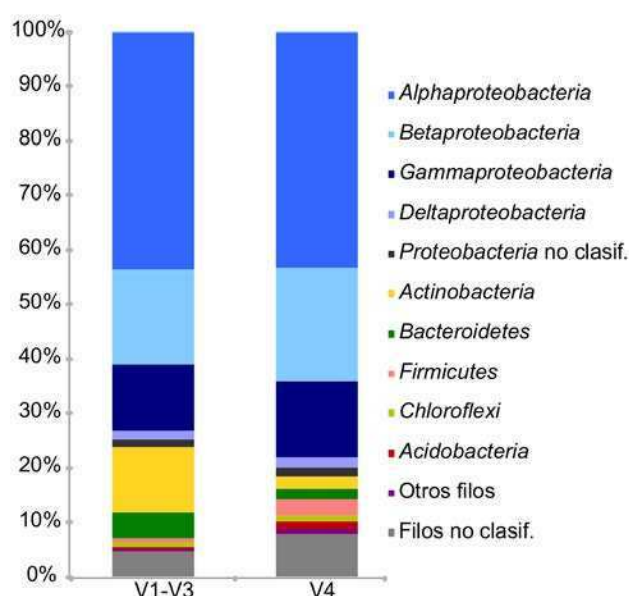
En base a la existencia de distintas zonas conservadas dentro del gen ARNr 16S, es posible optar por diferentes amplicones aptos para secuenciación paralela masiva, típicamente de entre 100 y 500 pb. El inconveniente radica en que los cebadores “universales” correspondientes varían en la eficiencia de apareamiento con el ADN molde y posterior amplificación, dadas las variaciones que pueden presentar las zonas conservadas a lo largo del espectro filogenético bacteriano. De esta forma, cada par de cebadores universales presenta una tendencia a favorecer la representación de grupos taxonómicos particulares (von Wintzingerode et al., 1997; Hong et al., 2009; Pinto y Raskin, 2012).

A modo de puesta a punto y con el objetivo de evaluar dos de los pares de cebadores utilizados con mayor frecuencia en censos bacterianos masivos para la estimación de medidas de diversidad y la asignación taxonómica de comunidades bacterianas de lodos activados, se estudió al conjunto de poblaciones bacterianas en una planta de tratamiento municipal (12 muestras mensuales) a partir de dos segmentos del gen ARNr 16S. El primero se extendió desde la región variable V1 hasta la región V3 y fue amplificado con los cebadores F27 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y R518 (5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'). El segundo incluyó solamente la región variable V4 y fue amplificado por los cebadores F563 (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') y R907 (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3'). Con las réplicas técnicas, se analizó un total de 48 muestras. La construcción de las bibliotecas y la pirosecuenciación fueron llevadas a cabo por el *Microbiome Core Facility* (North Carolina, EE.UU.), donde se generaron más de 250 mil lecturas de calidad para cada región amplificada (NCBI-SRA: SRP035875).

El procesamiento de las lecturas fue realizado de igual manera que para el conjunto de muestras de diferentes plantas de tratamiento de la primera parte. Como análisis estadístico multivariado, se optó por el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, del inglés, *Non-metric Multidimensional Scaling*) en base a la distancia Bray-Curtis a nivel de género bacteriano. El NMDS es una técnica ampliamente utilizada en ecología para detectar gradientes en comunidades biológicas.

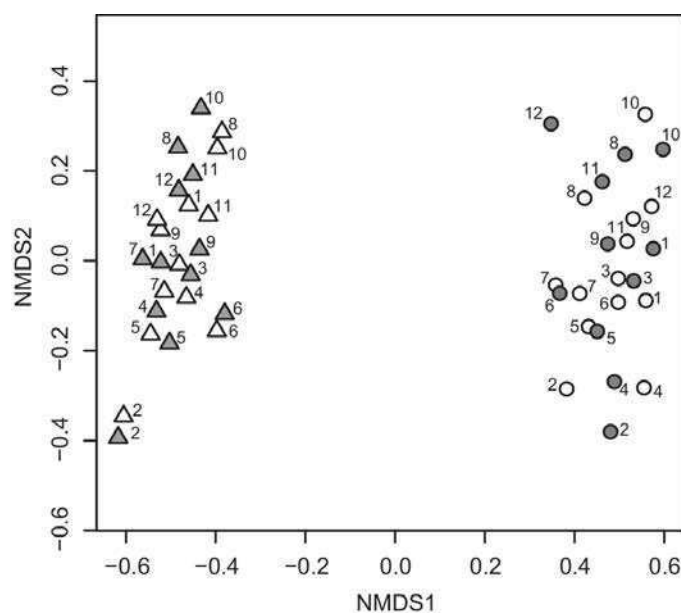
## Resultados

En el análisis de las lecturas obtenidas se detectó un sesgo asociado a la región amplificada. Ya a nivel de filo fue posible observar qué grupos eran los más afectados. Dentro del conjunto de secuencias correspondientes a los cebadores de la región V1-V3, las lecturas asignadas a *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* presentaron mayor abundancia relativa respecto a los mismos grupos determinados utilizando la región V4, mientras que los cebadores de esta última favorecieron abundancias relativas mayores para los filos *Acidobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Fig. A1).



**Figura A 1:** Distribución de los filos bacterianos y las clases de Proteobacteria según la región del ARNr 16S amplificada. Los datos para cada región corresponden al promedio de 12 muestras mensuales. Las secuencias fueron clasificadas contra la base de datos RDP. Los filos con abundancias promedio menores a 1% fueron agrupados en 'Otros filos' (*Spirochaetes*, *Armatimonadetes*, *Epsilonproteobacteria*, SR1, *Deinococcus-Thermus*, *Synergistetes*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, TM7 y *Planctomycetes*).

Respecto a las secuencias bacterianas no clasificadas, la proporción fue mayor en el conjunto de datos V4. Sin embargo, los datos V1-V3 se caracterizaron por una mayor riqueza de secuencias raras (es decir, de baja abundancia, ya sean clasificadas o no clasificadas), lo cual generó valores superiores de diversidad alfa y beta. En un ordenamiento de tipo *Non-metric Multidimensional Scaling* (NMDS) en función de la distancia Bray-Curtis entre muestras en base a la tabla de valores de abundancias de géneros bacterianos, las muestras se agruparon según la zona amplificada del ARNr 16S (Fig. A2).

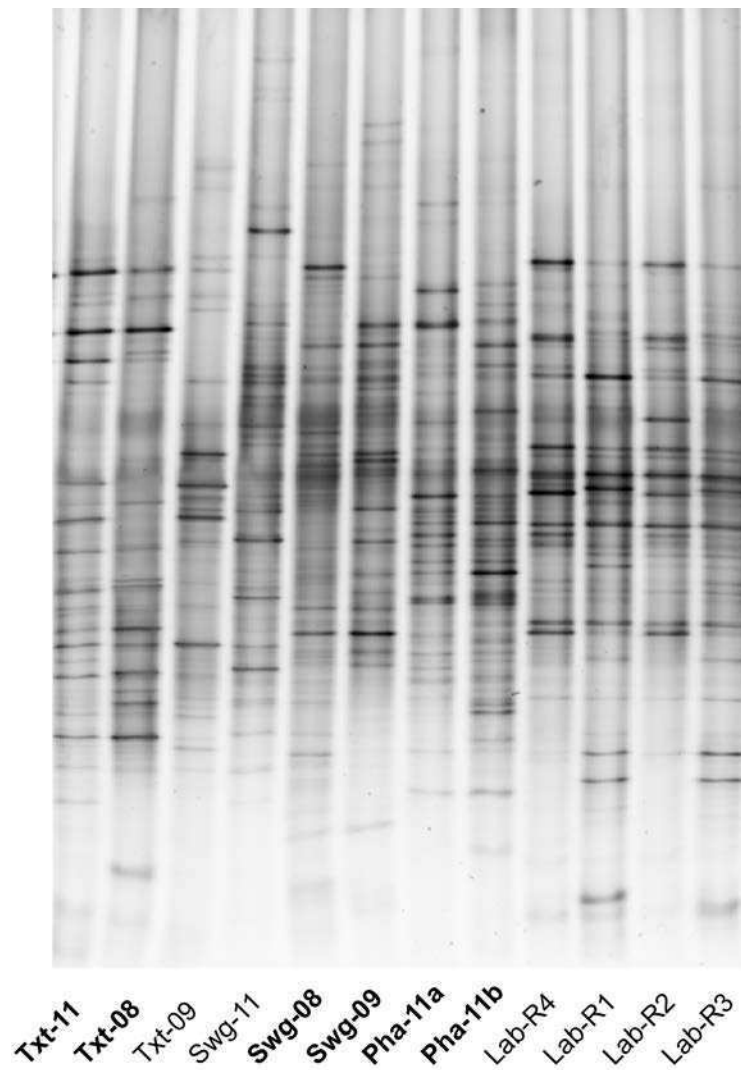


**Figura\_A 2:** Análisis NMDS sobre matriz de disimilitud Bray-Curtis en base a géneros. Los símbolos representan a cada una de las muestras: región V1-V3 (triángulos) y a la región V4 (círculos). Los números representan los meses. Las réplicas técnicas poseen el mismo símbolo y rótulo, pero diferente color (blanco o gris). Valor de *stress*=0,13.

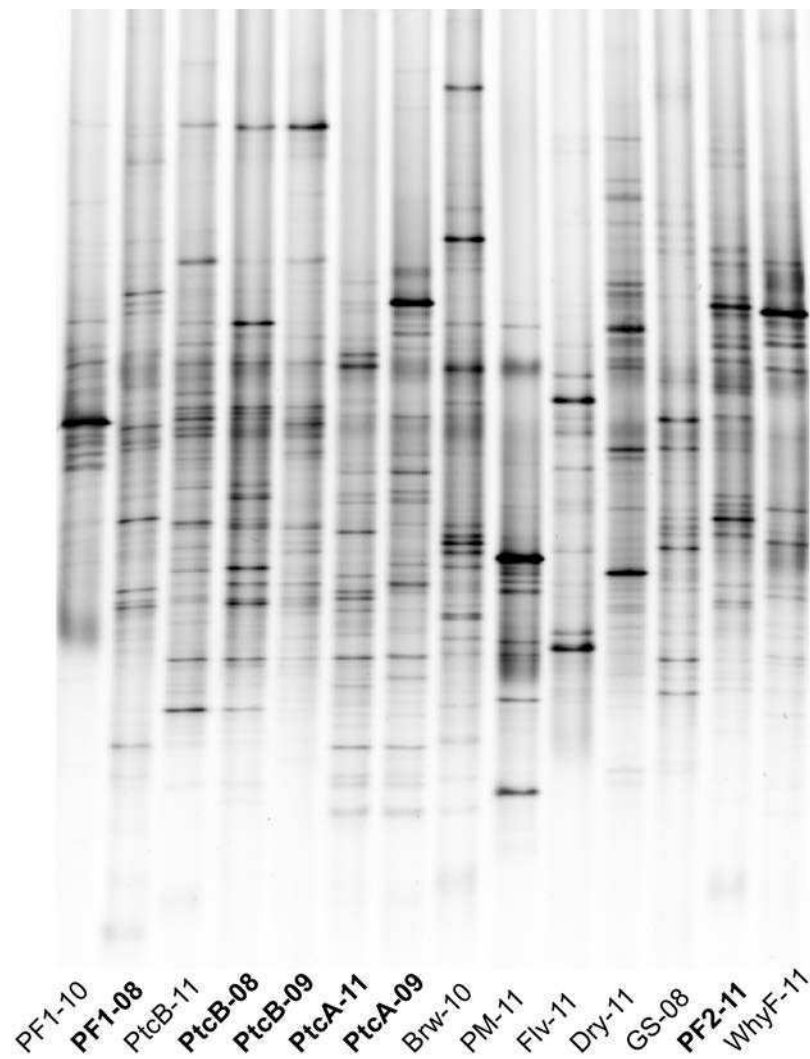
## Discusión

La selección de una región del gen de ARNr 16S para un análisis metagenómico basado en una amplificación por PCR conlleva un sesgo en la estimación de la diversidad (Sipos et al., 2007; Cai et al., 2013; Peiffer et al., 2013). No obstante, en la mayoría de los estudios, la comparación es válida por el hecho de que todas las muestras están sometidas al mismo sesgo. Aquí se determinó que el conjunto V1-V3 presentaba una mayor riqueza, lo que se podría explicar por los extremos no tan conservados de los cebadores de la región V4 (Vasileiadis et al., 2012). Sin embargo, las matrices V1-V3 y V4, que describían la disimilitud entre todos los pares de muestras en cada serie de tiempo, presentaron un alto valor de correlación (datos no presentados).

Debido a la diferencia en la eficiencia de amplificación que existe entre regiones, se detectaron distorsiones en los valores de abundancia relativa tanto de especies frecuentes como de especies minoritarias. Por otro lado, los procedimientos de asignación taxonómica también pueden afectar los resultados de los análisis de estructuras de comunidades hechos a partir de censos moleculares. En conjunto, estos factores son responsables de la separación de los datos de acuerdo a la región amplificada y no a la identidad de muestra. Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de caracterizar cuantitativamente a las diferentes poblaciones de una comunidad microbiana, especialmente si se realiza un monitoreo de grupos críticos para un proceso biotecnológico.

**ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE**

**Figura\_A 3:** Análisis preliminar por PCR-DGGE de la comunidad bacteriana en diferentes muestras de lodos activados. El ensayo se realizó en base a la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S, delimitado por los cebadores 341GCf y Eub518r. Se incluyen muestras que no fueron analizadas ni por pirosecuenciación ni por secuenciación al azar.

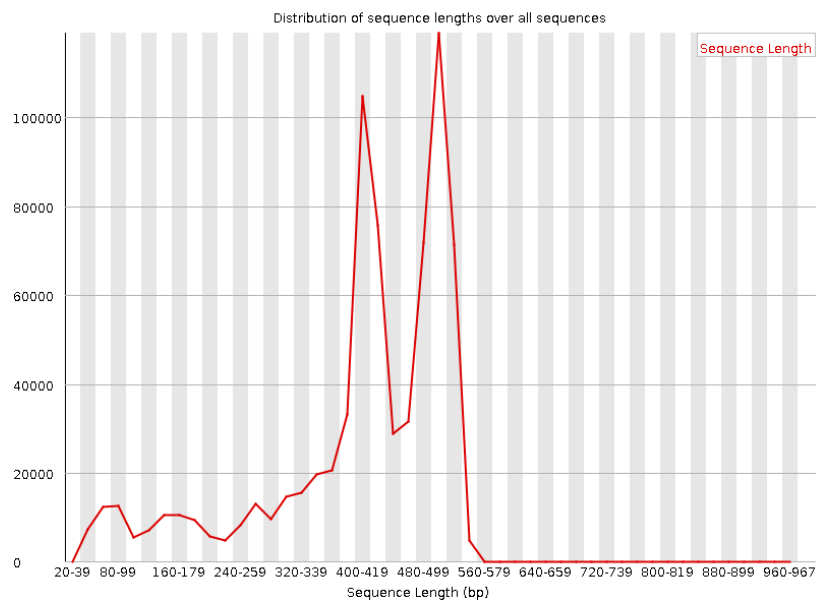


**Figura\_A 4:** Análisis preliminar por PCR-DGGE de la comunidad bacteriana en diferentes muestras de lodos activados. El ensayo se realizó en base a la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S, delimitado por los cebadores 341GCf y Eub518r. Se incluyen muestras que no fueron analizadas ni por pirosecuenciación ni por secuenciación al azar.

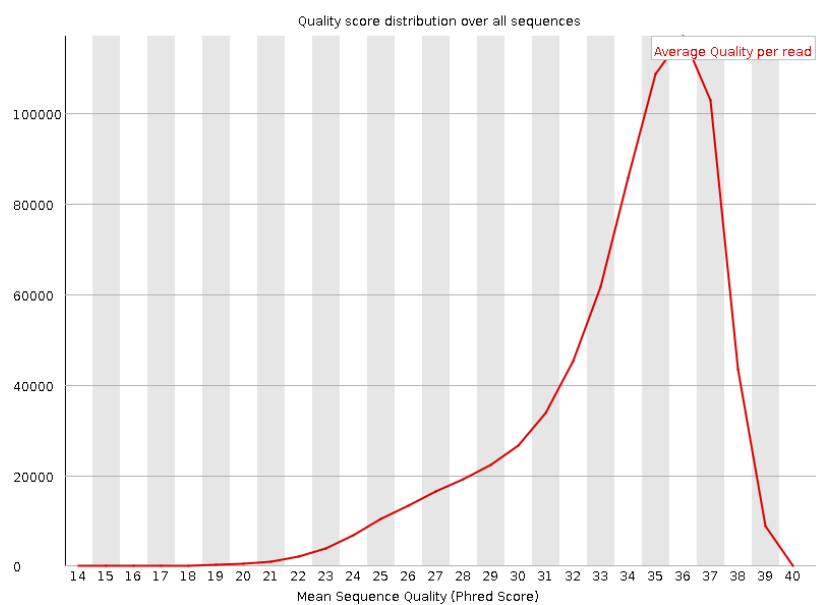


## PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES

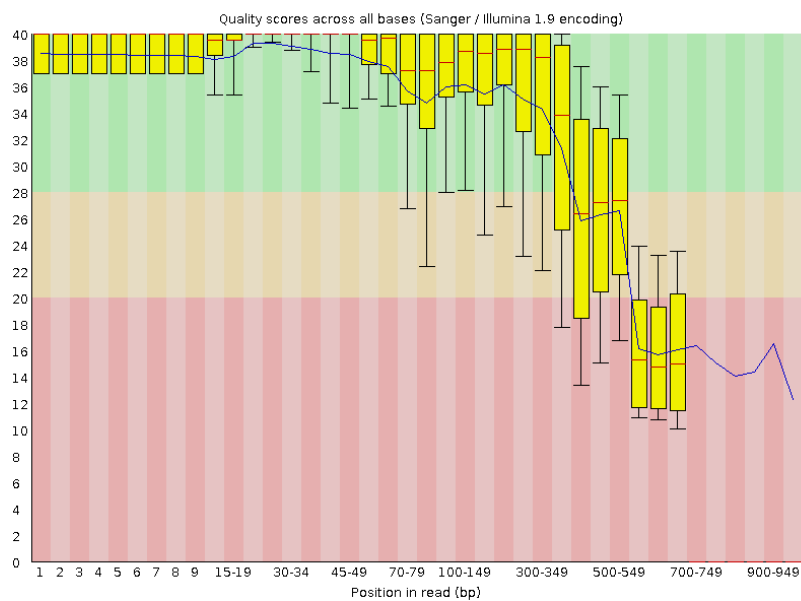
### Calidad de datos



**Figura\_A 5:** Distribución del largo de secuencia para un subconjunto de lecturas provenientes de la pirosecuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S.



**Figura\_A 6:** Distribución del puntaje de calidad (Phred) por secuencia para un subconjunto de lecturas provenientes de la pirosecuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S



**Figura\_A 7:** Puntajes de calidad a lo largo de las bases incorporadas en un subconjunto de lecturas provenientes de la pirosecuenciación de amplicones del gen de ARNr 16S

**Tablas de valores de abundancia relativa**

**Tabla\_A 1:** Valores de abundancias relativas (%) de filios bacterianos basadas en la pirosecuenciación de amplicones derivados del gen de ARNr 16S, con los conjuntos de secuencias submuestreados. Los grupos con tan sólo 1 representante (*singletons*) fueron excluidos.

Filo	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
OD1	0,560	0,340	0,000	0,020	0,320	0,000	0,020	0,020	0,380	0,320	0,060	0,100	0,000	0,000
<i>Actinobacteria</i>	0,160	0,500	0,360	0,381	0,100	0,673	0,260	2,260	9,042	0,440	1,580	0,300	3,121	24,380
TM7	0,080	2,740	0,020	0,080	0,000	0,042	1,500	10,360	0,640	0,140	2,740	0,000	12,863	6,300
<i>Spirochaetes</i>	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,140	0,140	0,600	0,580	0,000	0,280	0,000	0,000
<i>Bacteroidetes</i>	13,563	15,240	2,221	1,604	45,400	15,106	33,107	24,600	14,883	25,520	51,700	18,024	51,370	44,320
<i>Proteobacteria</i>	21,044	21,120	81,773	35,418	38,980	54,892	57,391	53,260	46,629	45,100	34,900	45,649	22,645	16,820
<i>Armatimonadetes</i>	0,040	0,740	0,020	0,060	0,000	0,105	0,000	0,000	0,240	0,160	0,020	0,040	0,000	0,040
<i>Nitrospira</i>	0,000	0,100	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	2,060	3,420	0,000	0,160	0,040	0,000
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,200	0,000	0,060	0,000	0,820	0,189	0,020	0,040	0,260	0,020	0,020	2,721	0,000	0,360
<i>Chlorobi</i>	0,000	0,000	1,301	1,303	1,380	1,999	0,000	0,040	0,100	0,220	0,020	0,000	0,120	0,040
<i>Acidobacteria</i>	2,521	10,140	10,244	56,324	0,080	0,694	0,180	0,500	1,060	0,760	0,180	0,960	0,340	0,620
<i>Firmicutes</i>	0,140	0,080	0,160	0,441	4,760	1,788	0,280	0,540	0,260	0,580	0,420	0,320	0,060	0,020
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,020	0,000	1,040	0,020	0,000	0,000	0,020	0,260	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Verrucomicrobia</i>	1,340	0,060	0,180	0,160	0,020	0,105	0,320	0,320	1,540	2,960	0,480	0,240	0,060	0,560
<i>Planctomycetes</i>	27,265	39,500	0,360	0,461	0,280	0,821	3,041	2,660	10,922	4,240	1,360	23,205	1,200	1,520
<i>Lentisphaerae</i>	1,880	2,500	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chloroflexi</i>	6,601	0,300	0,920	2,345	4,360	3,408	1,740	1,580	4,021	6,040	3,540	0,080	0,440	0,140
SR1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,160	0,220	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chlamydiae</i>	0,020	3,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Unclassified Bacteria	24,445	3,440	1,341	1,243	3,440	20,135	1,960	3,260	7,121	9,380	2,980	7,922	7,742	4,880

**Tabla\_A 2:** Valores de abundancias relativas (%) de clases bacterianas basadas en la pirosecuenciación de amplicones derivados del gen de ARNr 16S, con los conjuntos de secuencias submuestreados. Los grupos con tan sólo 1 representante (*singletons*) fueron excluidos.

Clase	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Actinobacteria</i>	0,160	0,500	0,360	0,381	0,100	0,673	0,260	2,260	9,042	0,440	1,580	0,300	3,121	24,380
<i>Spirochaetes</i>	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,140	0,140	0,600	0,580	0,000	0,280	0,000	0,000
<i>Bacteroidetes incertae sedis</i>	0,080	0,320	0,320	0,000	0,000	0,000	7,762	0,700	0,620	0,240	0,020	1,980	0,420	0,420
<i>Bacteroidia</i>	0,020	0,000	0,000	0,020	0,020	0,021	0,200	0,180	0,160	0,400	0,180	0,100	0,000	0,000
<i>Sphingobacteria</i>	13,243	12,860	1,240	1,243	35,700	13,739	20,524	20,840	12,523	20,780	42,200	9,562	49,550	37,200
<i>Flavobacteria</i>	0,020	1,160	0,360	0,241	0,640	0,589	0,400	1,480	0,600	1,380	5,600	4,201	1,100	4,560
<i>Epsilonproteob.</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,021	0,260	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Deltaproteob.</i>	5,941	0,780	1,801	0,942	0,400	1,788	0,820	0,880	5,261	3,300	0,700	5,201	0,980	0,720
<i>Betaproteob.</i>	3,761	9,180	37,715	11,866	27,840	38,313	35,687	28,640	22,204	22,420	12,300	27,746	0,920	5,000
<i>Alphaproteob.</i>	5,541	10,200	14,566	16,797	3,820	4,713	16,143	20,460	6,641	1,680	9,620	7,061	8,902	4,820
<i>Gammaproteob.</i>	2,621	0,300	26,751	5,372	6,320	7,742	2,761	1,280	8,582	14,420	11,760	2,721	10,642	4,560
<i>Armatimonadia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Nitrospira</i>	0,000	0,100	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	2,060	3,420	0,000	0,160	0,040	0,000
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,200	0,000	0,060	0,000	0,820	0,189	0,020	0,040	0,260	0,020	0,020	2,721	0,000	0,360
<i>Chlorobia</i>	0,000	0,000	0,000	0,080	0,060	1,368	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ignavibacteria</i>	0,000	0,000	1,301	1,183	1,320	0,610	0,000	0,000	0,020	0,180	0,000	0,000	0,080	0,040

Clase	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Acidobacteria Gp4</i>	2,480	10,140	10,004	56,204	0,020	0,000	0,120	0,400	0,360	0,460	0,040	0,800	0,340	0,580
<i>Acidobacteria Gp3</i>	0,020	0,000	0,060	0,120	0,040	0,021	0,000	0,040	0,280	0,200	0,000	0,080	0,000	0,000
<i>Acidobacteria Gp1</i>	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acidobacteria Gp7</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acidobacteria Gp6</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,610	0,000	0,060	0,260	0,060	0,020	0,060	0,000	0,040
<i>Holophagae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,040	0,020	0,120	0,000	0,000	0,000
<i>Acidobacteria Gp17</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acidobacteria Gp16</i>	0,020	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Clostridia</i>	0,020	0,000	0,140	0,241	4,160	1,452	0,140	0,400	0,180	0,400	0,240	0,120	0,000	0,000
<i>Bacilli</i>	0,000	0,080	0,020	0,180	0,000	0,042	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,020
<i>Negativicutes</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,020	0,000	0,000	0,000	0,140	0,020	0,000
<i>Erysipelotrichia</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,180	0,000	0,000	0,000
<i>Deinococci</i>	0,020	0,000	1,040	0,020	0,000	0,000	0,020	0,260	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Spartobacteria</i>	0,420	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Opitutae</i>	0,400	0,000	0,000	0,020	0,020	0,042	0,220	0,060	0,240	0,440	0,340	0,120	0,000	0,460
<i>Verrucomicrobiae</i>	0,060	0,000	0,120	0,120	0,000	0,063	0,060	0,220	1,180	1,140	0,140	0,120	0,060	0,080
Subdivision3	0,400	0,060	0,060	0,020	0,000	0,000	0,020	0,020	0,080	1,260	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Planctomycetacia</i>	25,105	39,360	0,140	0,401	0,280	0,821	2,921	2,480	10,762	4,080	1,340	6,901	1,180	1,460
<i>Phycisphaerae</i>	2,120	0,000	0,200	0,060	0,000	0,000	0,120	0,160	0,160	0,160	0,020	16,083	0,000	0,020
<i>Lentisphaeria</i>	1,880	2,500	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Anaerolineae</i>	0,000	0,020	0,560	1,203	3,880	3,093	0,000	0,020	2,160	5,740	0,060	0,020	0,200	0,000
<i>Thermomicrobia</i>	0,000	0,080	0,040	0,020	0,200	0,168	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
<i>Caldilineae</i>	0,400	0,040	0,300	1,082	0,080	0,126	0,580	0,700	1,560	0,200	3,440	0,060	0,140	0,100
<i>Chloroflexi</i>	5,781	0,140	0,020	0,000	0,020	0,000	1,040	0,820	0,080	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chlamydiae</i>	0,020	3,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

**Tabla A 3:** Valores de abundancias relativas (%) de géneros bacterianos basadas en la pirosecuenciación de amplicones derivados del gen de ARNr 16S, con los conjuntos de secuencias submuestreados. Los grupos con tan sólo 1 representante (*singletons*) fueron excluidos.

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
OD1 genera incertae sedis	0,560	0,340	0,000	0,020	0,320	0,000	0,020	0,020	0,380	0,320	0,060	0,100	0,000	0,000
<i>Aciditerrimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ilumatobacter</i>	0,060	0,020	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	5,761	0,040	0,000	0,120	0,000	0,140
<i>Ferrithrix</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Iamia</i>	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,042	0,020	0,080	0,620	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Conexibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tetrasphaera</i>	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,380	0,000	0,000	0,000
<i>Arthrobacter</i>	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Humibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,084	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Agrococcus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Microbacterium</i>	0,000	0,320	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Leucobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,358	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,000
<i>Nakamurella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	1,220	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Micropruina</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,420	11,260
<i>Microlunatus</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	1,520
<i>Propionicimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,620	1,620
<i>Tessaracoccus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,860	8,140

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Auraticoccus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
<i>Gordonia</i>	0,000	0,060	0,020	0,000	0,000	0,021	0,020	0,000	0,500	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000
<i>Mycobacterium</i>	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,020	0,320	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000
TM7 genera incertae sedis	0,080	2,740	0,020	0,080	0,000	0,042	1,500	10,360	0,640	0,140	2,740	0,000	12,863	6,300
<i>Treponema</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,120	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Turneriella</i>	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,020	0,500	0,560	0,000	0,280	0,000	0,000
<i>Leptonema</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ohtaekwangia</i>	0,080	0,320	0,320	0,000	0,000	0,000	7,762	0,700	0,620	0,240	0,020	1,980	0,420	0,420
<i>Alkaliflexus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,100	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Prevotella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Bacteroides</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,060	0,000	0,000
<i>Paludibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,180	0,100	0,000	0,020	0,120	0,000	0,000	0,000
<i>Aquiflexum</i>	0,020	0,100	0,080	0,000	0,000	0,000	0,600	0,180	0,020	0,040	0,000	1,880	0,000	0,160
<i>Algoriphagus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Lewinella</i>	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	23,625	1,420
<i>Aureispira</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,000
<i>Haliscomenobacter</i>	4,801	8,200	0,040	0,000	0,120	6,901	0,860	8,000	5,961	10,860	20,860	0,080	22,745	11,400
<i>Leadbetterella</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,100	0,000	0,080	3,800
<i>Meniscus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,160	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020
<i>Cytophaga</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,220	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Persicitalea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,820
<i>Dyadobacter</i>	0,420	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sporocytophaga</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Spirosoma</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Runella</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,320	0,060	0,160	0,060	0,120	0,060	0,000	0,000
<i>Sediminibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	3,760	0,040	0,080	0,020	0,000	0,000	0,080
<i>Lacibacter</i>	5,361	0,180	0,000	0,000	0,140	0,147	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Filimonas</i>	0,020	0,020	0,020	0,020	0,100	0,000	0,020	0,260	2,020	0,580	0,980	0,000	0,000	0,100
<i>Flaviumibacter</i>	0,080	0,000	0,000	0,000	0,240	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Flavisolibacter</i>	0,140	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ferruginibacter</i>	0,000	0,000	0,120	0,060	0,020	0,000	4,261	0,700	0,120	0,100	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Niastella</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,240	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Terrimonas</i>	0,000	0,000	0,160	0,040	0,040	0,021	3,981	0,960	0,220	2,540	6,880	0,060	0,080	0,980
<i>Segetibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,140	0,040	0,000	0,000	0,000
<i>Flavitalea</i>	0,020	0,000	0,180	0,261	0,000	0,000	0,020	0,000	0,040	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000
<i>Niabella</i>	0,020	0,900	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	5,480	0,000	0,000	0,520
<i>Solitalea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Olivibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	10,300
<i>Pedobacter</i>	0,060	0,040	0,000	0,000	0,020	0,021	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Parapedobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
<i>Crocinitomix</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000
<i>Owenweeksia</i>	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,147	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Wandonia</i>	0,000	0,020	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,060	0,280	0,060	0,000
<i>Flavobacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,720	0,100	0,080	2,560	0,540	0,280	0,880
<i>Cloacibacterium</i>	0,000	0,500	0,000	0,120	0,000	0,021	0,060	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chryseobacterium</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
<i>Mariniflexile</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,560	0,600
<i>Sandarakinotalea</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,020	0,000	0,000
<i>Sulfurospirillum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Arcobacter</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,180	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Bdellovibrio</i>	0,040	0,000	0,180	0,862	0,040	0,168	0,260	0,200	0,100	0,040	0,060	0,260	0,040	0,000

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Vampirovibrio</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,100	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000
<i>Peredibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Bacteriovorax</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,160	0,180	0,040	0,000
<i>Geobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Geokalkalibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
<i>Desulfobulbus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Desulforegula</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000
<i>Hyalangium</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Archangium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Byssovorax</i>	0,080	0,060	0,000	0,000	0,000	0,042	0,040	0,000	0,100	0,120	0,000	0,800	0,160	0,040
<i>Sorangium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,120	0,040	0,120	0,120	0,080	0,020	0,000
<i>Koffleria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,460	0,100	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Nannocystis</i>	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,380	0,060	0,000	0,380	0,000	0,000
<i>Haliangium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000
<i>Nitrosomonas</i>	0,020	0,000	0,000	0,281	0,280	0,000	0,000	0,000	0,180	0,080	0,040	0,140	0,020	0,000
<i>Nitrosospira</i>	0,000	0,000	0,020	0,481	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Methylibium</i>	0,000	0,000	0,120	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Leptothrix</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,340	1,340	0,180	3,300	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Tepidimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Piscinibacter</i>	0,000	0,000	0,760	0,241	0,540	1,178	0,100	0,040	0,040	0,180	0,000	0,260	0,000	0,000
<i>Aquabacterium</i>	0,040	0,000	0,020	0,040	0,020	0,189	0,140	0,060	0,060	0,460	0,040	0,040	0,000	0,000
<i>Aquicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,080	0,000	0,080	0,020	0,120	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mitsuaria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,120	0,000	0,000
<i>Rubrivivax</i>	1,820	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,360	0,120	0,200	1,000	0,040	1,980	0,040	0,020
<i>Sphaerotilus</i>	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,240	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Inhella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,000
<i>Thiobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,420	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Xylophilus</i>	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,020	0,020	0,060	0,000	0,000	0,060
<i>Ideonella</i>	0,020	0,000	0,400	0,301	0,000	0,000	0,500	0,320	0,240	0,740	0,000	1,060	0,000	0,000
<i>Rivibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Cupriavidus</i>	0,000	0,000	0,840	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ralstonia</i>	0,000	0,000	0,080	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Polynucleobacter</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Burkholderia</i>	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chitinimonas</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	2,120	2,780	0,540	0,000	0,000
<i>Derxia</i>	0,020	0,060	0,080	0,080	5,260	0,463	0,000	0,000	1,100	0,140	0,040	0,040	0,000	0,000
<i>Parapusillimonas</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ramlibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	0,220	0,240	0,040	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Simplicispira</i>	0,020	0,000	0,320	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,680	0,900	2,040	0,760	0,000	0,240
<i>Brachymonas</i>	0,000	0,000	0,080	3,668	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	5,501	0,000	0,000
<i>Comamonas</i>	0,000	0,000	0,560	0,060	0,040	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Caenimonas</i>	0,020	0,000	0,020	0,000	0,020	0,189	0,280	1,500	1,460	0,260	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Pseudorhodoferax</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,700	0,160	1,200	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Roseateles</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000
<i>Schlegelella</i>	0,000	0,000	0,020	0,020	0,020	0,147	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Curvibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,420	0,620	0,480	0,340	0,020	0,000	0,040	0,020
<i>Giesbergeria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Caldimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,147	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ottowia</i>	0,000	0,000	2,141	1,523	0,000	0,337	0,000	0,040	3,701	0,380	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Diaphorobacter</i>	0,000	3,760	10,024	0,361	1,600	1,283	0,080	0,000	0,040	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000
<i>Acidovorax</i>	0,000	0,080	0,200	0,020	0,000	0,000	0,120	0,240	0,220	0,100	0,000	0,180	0,000	0,000

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Hydrogenophaga</i>	0,480	1,760	0,200	0,100	0,000	0,021	0,020	1,940	0,200	0,220	0,160	0,960	0,020	0,340
<i>Alicycliphilus</i>	0,000	0,160	1,821	0,000	0,200	0,021	0,020	0,060	0,060	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000
<i>Pelomonas</i>	0,060	0,000	0,040	0,000	0,040	0,000	0,220	0,140	0,000	0,120	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Massilia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000
<i>Janthinobacterium</i>	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Undibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,160	0,000	0,000
<i>Sulfuricella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Thiobacillus</i>	0,000	0,020	2,101	1,363	8,820	14,980	0,140	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Methyloversatilis</i>	0,000	0,000	0,060	0,000	0,320	0,042	0,900	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Dechloromonas</i>	0,000	0,000	0,400	0,020	0,000	0,000	13,183	1,660	0,220	0,820	0,460	0,040	0,040	0,200
<i>Sterolibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,960	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Georgfuchsia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ferribacterium</i>	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,760	0,240	0,000	0,040	0,040	0,000	0,000	0,100
<i>Thauera</i>	0,000	0,160	1,561	0,120	0,260	2,420	0,440	0,140	0,260	0,240	4,140	2,721	0,460	0,980
<i>Shinella</i>	0,000	0,120	0,040	0,621	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Propionivibrio</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,680	1,052	0,040	0,000	0,300	0,480	0,320	0,000	0,020	0,000
<i>Denitratisona</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,240	0,673	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Uliginosibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Zoogloea</i>	0,000	0,000	0,860	0,000	0,800	0,063	11,642	9,400	0,180	0,100	0,140	7,481	0,000	0,000
<i>Azoarcus</i>	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,060	0,060	1,440
<i>Azonexus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,320	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Azospira</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sulfuritalea</i>	0,000	0,000	0,000	0,341	0,000	0,000	0,000	0,000	0,260	0,800	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Elioraea</i>	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Bradyrhizobium</i>	0,000	0,000	1,761	1,463	0,000	0,000	0,740	0,180	0,380	0,040	0,000	0,020	0,060	0,000
<i>Afipia</i>	0,000	0,000	0,780	1,503	0,000	0,000	0,880	0,040	0,040	0,020	0,000	0,060	0,000	0,000
<i>Bosea</i>	0,000	0,040	0,040	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080
<i>Nitrobacter</i>	0,020	0,000	0,100	0,180	0,040	0,021	0,000	0,000	0,080	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Agromonas</i>	0,000	0,000	0,380	0,481	0,000	0,000	0,060	0,020	0,080	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Oligotropha</i>	0,000	0,000	0,160	0,401	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Kaistia</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhizobium</i>	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sinorhizobium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000
<i>Methylocystis</i>	0,000	0,000	0,040	1,323	0,000	0,000	0,200	0,680	0,160	0,040	0,080	0,000	0,000	0,000
<i>Pleomorphomonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,020	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Methylocapsa</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,120	0,000	0,000
<i>Methylocella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Camelimonas</i>	0,000	0,000	0,200	0,060	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Beijerinckia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
<i>Chelatococcus</i>	0,000	3,300	0,000	0,060	0,000	0,042	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Methylovirgula</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Tepidamorphus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Phyllobacterium</i>	0,000	0,000	0,180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mesorhizobium</i>	0,000	0,000	0,140	0,200	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aquamicrobium</i>	0,000	2,980	0,020	0,060	0,080	0,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mycoplana</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ochrobactrum</i>	0,000	0,800	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Bauldia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
<i>Vasilyevaea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Azorhizobium</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,080	1,300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Xanthobacter</i>	0,000	0,000	0,220	0,641	0,000	0,000	0,340	0,880	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Prosthecomicrobium</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,060	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
<i>Rhodoplanes</i>	0,000	0,020	0,000	0,140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hyphomicrobium</i>	0,080	0,040	0,780	2,766	0,880	0,252	2,180	0,540	0,240	0,020	0,140	0,020	0,000	0,020
<i>Blastochloris</i>	0,020	0,020	0,220	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pedomicrobium</i>	0,000	0,000	0,000	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Microvirga</i>	0,000	0,000	0,020	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aurantimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hyphomonas</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,560	0,000	0,000
<i>Maricaulis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Caulobacter</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,040	0,160	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Brevundimonas</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200
<i>Phenylobacterium</i>	0,240	0,000	0,020	0,060	0,000	0,000	0,020	0,140	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Orientia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Blastomonas</i>	0,020	0,000	0,000	0,100	0,020	0,126	0,040	0,000	0,000	0,020	0,020	0,020	0,000	0,020
<i>Sphingomonas</i>	0,040	0,360	0,320	0,281	0,000	0,168	0,000	0,160	0,140	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
<i>Sphingopyxis</i>	0,660	0,260	0,680	0,421	0,040	0,000	0,140	0,020	0,180	0,000	0,280	0,060	0,000	0,000
<i>Novosphingobium</i>	0,000	0,020	0,060	0,060	0,000	0,000	0,180	0,160	0,200	0,000	0,620	0,020	0,000	0,000
<i>Sphingosinicella</i>	0,000	0,140	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,020
<i>Sphingobium</i>	0,020	0,020	0,280	0,942	0,000	0,042	1,340	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Porphyrobacter</i>	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
<i>Altererythrobacter</i>	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,000
<i>Dongia</i>	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,060	0,140	0,060	0,000	0,000	0,320	0,000	0,000
<i>Defluviicoccus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,136	0,260	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Roseomonas</i>	0,180	0,600	0,140	0,000	0,080	0,463	0,260	0,120	0,020	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
<i>Rhodovarius</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,020	0,042	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tanticharoenia</i>	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhodobacter</i>	0,080	0,380	0,140	0,100	1,420	0,063	1,160	4,360	0,520	0,060	0,080	0,260	2,300	0,300
<i>Haematobacter</i>	0,060	0,000	0,020	0,000	0,000	0,042	0,020	0,060	0,040	0,000	0,020	0,000	0,020	0,020
<i>Thioclava</i>	0,000	0,000	0,080	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Paracoccus</i>	0,080	0,040	0,000	0,000	0,460	0,021	0,000	0,000	0,020	0,000	0,180	0,000	3,721	0,040
<i>Gemmobacter</i>	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,140	0,260	0,000	0,020	0,000	0,060	0,340
<i>Catellibacterium</i>	0,400	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,160	0,640	0,100	0,000	0,120	0,060	0,020	0,000
<i>Litoreibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000
<i>Amaricoccus</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,620	0,300	0,020	0,000	0,000	0,000	0,300	1,620
<i>Agaricicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Seohaecicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
<i>Roseicyclus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Pseudoruegeria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,480	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pseudorhodobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Thiohalobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,140	0,080
<i>Umboniibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Perlucidibaca</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,360	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acinetobacter</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,440	0,260	0,000	0,080	0,040	0,080	0,000	0,000
<i>Alkanindiges</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Cellvibrio</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,320	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Serpens</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,100	0,000	0,080	0,940	0,220	0,220	0,000	0,000
<i>Pseudomonas</i>	0,000	0,040	0,000	0,020	0,000	0,000	0,260	0,000	0,180	0,360	2,260	0,120	0,000	0,000
<i>Rhizobacter</i>	0,000	0,000	3,241	1,644	0,000	0,000	0,020	0,020	2,881	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Azomonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,260	0,000	0,000	0,000
<i>Azotobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Thioflavicoccus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	0,000	0,060	0,000



Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Rheinheimera</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,020	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Nitrosococcus</i>	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ectothiorhodospinus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Thiorhodospira</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hahella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	1,240	0,040	0,000	0,000
<i>Legionella</i>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,060	0,020	0,000	0,100	0,020	0,040
<i>Aquicella</i>	0,060	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Steroidobacter</i>	0,080	0,000	0,560	0,321	0,020	2,714	0,000	0,000	0,240	0,120	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Pseudofulvimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,860
<i>Rudaea</i>	0,020	0,000	21,829	1,784	0,000	0,000	0,180	0,000	0,060	0,060	0,300	0,020	0,000	0,000
<i>Dokdonella</i>	0,000	0,000	0,260	0,962	0,000	0,000	0,400	0,280	0,020	0,000	0,020	0,500	0,020	0,000
<i>Lysobacter</i>	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,240	0,000	0,280	0,220	0,000	0,020
<i>Aquimonas</i>	0,400	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,200	0,020	0,300	0,400	0,120	0,000	0,000	0,060
<i>Thermomonas</i>	0,000	0,000	0,300	0,261	0,180	0,021	0,000	0,300	0,160	0,000	0,900	0,420	0,000	0,000
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aeromonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,240	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Tolumonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Haliea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,360	2,140	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Methylocaldum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Methylosarcina</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Armatimonadetes gp5</i>	0,040	0,740	0,020	0,060	0,000	0,084	0,000	0,000	0,240	0,080	0,020	0,020	0,000	0,040
<i>Armatimonas/Armatimonadetes gp1</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Nitrospira</i>	0,000	0,100	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	2,060	3,420	0,000	0,160	0,040	0,000
<i>Gemmatimonas</i>	0,200	0,000	0,060	0,000	0,820	0,189	0,020	0,040	0,260	0,020	0,020	2,721	0,000	0,360
<i>Chloroherpeton</i>	0,000	0,000	0,000	0,080	0,060	1,283	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ignavibacterium</i>	0,000	0,000	1,301	1,183	1,320	0,610	0,000	0,000	0,020	0,180	0,000	0,000	0,080	0,040
Gp4	2,480	10,140	10,004	56,204	0,020	0,000	0,120	0,400	0,360	0,460	0,040	0,800	0,340	0,580
Gp3	0,000	0,000	0,060	0,120	0,020	0,000	0,000	0,040	0,280	0,180	0,000	0,040	0,000	0,000
Gp1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gp7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gp6	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,610	0,000	0,060	0,260	0,060	0,020	0,060	0,000	0,040
<i>Geothrix</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,040	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000
<i>Holophaga</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
Gp17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
Gp16	0,020	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Fusibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
<i>Acidaminobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	1,100	0,442	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Anaerovorax</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,295	0,000	0,000	0,040	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,000	0,000	0,020	0,060	0,000	0,000	0,040	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Proteinclasticum</i>	0,000	0,000	0,080	0,020	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Lachnospiracea incertae sedis</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Soehngenia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	2,900	0,505	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Oscillibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Clostridium XI</i>	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,020	0,040	0,020	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Trichococcus</i>	0,000	0,000	0,020	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pasteuria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Staphylococcus</i>	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Veillonella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000

Género	TXT-08	TXT-11	PTCb-08	PTCb-09	PTCa-09	PTCa-11	PHA-5/11	PHA-7/11	SWGa-08	SWGa-09	PF2-11	PF1-08	WHY-10	WHY-11
<i>Succinispira</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Erysipelothrix</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,000
<i>Truepera</i>	0,020	0,000	0,860	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Meiothermus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,260	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Spartobacteria</i> genera incertae sedis	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Opitutus</i>	0,060	0,000	0,000	0,020	0,020	0,042	0,220	0,060	0,180	0,400	0,340	0,100	0,000	0,400
<i>Alterococcus</i>	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Luteolibacter</i>	0,040	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,740	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Verrucomicrobium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,220	0,060	0,040	0,020	0,060	0,020	0,000
<i>Prostheco bacter</i>	0,000	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,780	0,200	0,100	0,020	0,020	0,080
<i>Akkermansia</i>	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Subdivision3 genera incertae sedis	0,400	0,060	0,060	0,020	0,000	0,000	0,020	0,020	0,080	1,260	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Planctomyces</i>	1,600	0,820	0,040	0,120	0,040	0,126	0,280	0,320	1,580	0,320	0,080	2,621	0,520	0,040
<i>Schlesneria</i>	0,300	0,020	0,020	0,000	0,000	0,000	0,880	0,540	1,760	1,080	0,020	0,440	0,000	0,060
<i>Gemmata</i>	2,621	0,000	0,000	0,020	0,040	0,000	0,040	0,240	3,341	0,140	0,020	0,220	0,000	0,000
<i>Rhodopirellula</i>	0,640	1,140	0,000	0,040	0,020	0,000	0,000	0,020	0,100	0,020	0,000	0,060	0,500	0,240
<i>Blastopirellula</i>	0,020	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,160	0,020	0,660	0,020	0,000
<i>Zavarzinella</i>	0,700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,120	0,500	0,280	0,000	0,100	0,000	0,000
<i>Isosphaera</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,168	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Singulisphaera</i>	0,020	0,020	0,020	0,040	0,000	0,400	0,000	0,020	0,180	0,020	0,000	0,020	0,040	0,000
<i>Phycisphaera</i>	2,120	0,000	0,200	0,060	0,000	0,000	0,120	0,160	0,160	0,160	0,020	16,083	0,000	0,020
<i>Victivallis</i>	0,780	0,780	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Levilinea</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,380	0,316	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Leptolinea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,280	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Anaerolinea</i>	0,000	0,000	0,400	0,401	0,100	0,337	0,000	0,020	0,000	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000
<i>Longilinea</i>	0,000	0,000	0,080	0,421	0,440	0,189	0,000	0,000	0,180	0,700	0,020	0,000	0,080	0,000
<i>Bellilinea</i>	0,000	0,000	0,020	0,100	0,800	0,274	0,000	0,000	0,280	1,340	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sphaerobacter</i>	0,000	0,080	0,040	0,020	0,200	0,168	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
<i>Caldilinea</i>	0,400	0,040	0,300	1,082	0,080	0,126	0,580	0,700	1,560	0,200	3,440	0,060	0,140	0,100
<i>Herpetosiphon</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Roseiflexus</i>	5,221	0,020	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Heliothrix</i>	0,080	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,360	0,780	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SR1 genera incertae sedis	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,160	0,220	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000

# Referencias

- Abbai, N.S., Govender, A., Shaik, R., y Pillay, B. (2012) Pyrosequence analysis of unamplified and whole genome amplified DNA from hydrocarbon-contaminated groundwater. *Mol. Biotechnol.* **50**: 39-48.
- Adamczyk, M. y Jagura-Burdzy, G. (2003) Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim. Pol.* **50**: 425-453.
- Addison, S., Slade, A., y Dennis, M. (2011) Effects of substrate composition on the structure of microbial communities in wastewater using fluorescence in situ hybridisation. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 337-343.
- Akarsubasi, A.T., Eyice, O., Miskin, I., Head, I.M., y Curtis, T.P. (2009) Effect of sludge age on the bacterial diversity of bench scale sequencing batch reactors. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 2950-2956.
- Akarsubasi, A.T., Ince, O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., et al. (2005) Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Res.* **39**: 1576-1584.
- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K.L., Tyson, G.W., y Nielsen, P.H. (2013) Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat. Biotechnol.* **31**: 533-8.
- Allison, S.D. y Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105 Suppl**: 11512-11519.
- Amann, R.I., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Anderson, M.J. y Willis, T.J. (2003) Canonical analysis of principal coordinates: A useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology* **84**: 511-525.
- Ardern, E. y Lockett, W.T. (1914) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *J. Soc. Chem. Ind.* **33**: 523-539.
- Ayarza, J.M. y Erijman, L. (2011) Balance of Neutral and Deterministic Components in the Dynamics of Activated Sludge Floc Assembly. *Microb. Ecol.* **61**: 486-495.
- Ayarza, J.M., Guerrero, L.D., y Erijman, L. (2010) Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. *Microb. Ecol.* **59**: 436-444.
- AySA (2010) [www.aysa.com.ar/Media/archivos/570/Informe\\_al\\_Usuario\\_2010.pdf](http://www.aysa.com.ar/Media/archivos/570/Informe_al_Usuario_2010.pdf).
- Baas-Becking, L.G.M. (1934) Geobiologie of inleiding tot de milieukunde.
- Bahl, M.I., Burmølle, M., Meisner, A., Hansen, L.H., y Sørensen, S.J. (2009) All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel  $\epsilon$  subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* **62**: 134-139.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., y McArthur, J. V. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**: 176-182.
- Balser, T.C., McMahon, K.D., Bart, D., Bronson, D., Coyle, D.R., Craig, N., et al. (2006) Bridging the gap between micro - and macro-scale perspectives on the role of microbial communities in global change ecology. *Plant Soil* **289**: 59-70.
- Barberán, A., Casamayor, E.O., y Fierer, N. (2014) The microbial contribution to macroecology. *Front. Microbiol.* **5**:

- Barberán, A., Fernández-Guerra, A., Bohannon, B.J.M., y Casamayor, E.O. (2012) Exploration of community traits as ecological markers in microbial metagenomes. *Mol. Ecol.* **21**: 1909-1917.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., y Ploy, M.C. (2010) Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 1642-1645.
- De Beer, D., Schramm, A., Santegoeds, C.M., y Nielsen, H.K. (1998) Anaerobic processes in activated sludge. En, *Water Science and Technology*., pp. 605-608.
- Bentley, S.D. y Parkhill, J. (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 771-92.
- Berg, G. y Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**: 1-13.
- Biers, E.J., Sun, S., y Howard, E.C. (2009) Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: Interrogating the global ocean sampling metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2221-2229.
- Bolger, A.M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.
- Botton, S., van Heusden, M., Parsons, J.R., Smidt, H., y van Straalen, N. (2006) Resilience of microbial systems towards disturbances. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**: 101-112.
- Boursier, H., Béline, F., y Paul, E. (2004) Activated Sludge Model No. 1 calibration for piggery wastewater treatment using respirometry. *Water Sci. Technol.* **49**: 389-396.
- Bramucci, M. y Nagarajan, V. (2006) Bacterial communities in industrial wastewater bioreactors. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 275-278.
- Briones, A. y Raskin, L. (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 270-276.
- Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Parker, J.P.M., Zubietta, I.X., Piceno, Y.M., y Andersen, G.L. (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 299-304.
- Van den Broeck, R.M.R., Van Impe, J.F.M., y Smets, I.Y.M. (2009) Assessment of activated sludge stability in lab-scale experiments. *J. Biotechnol.* **141**: 147-154.
- Brown, C.T., Hug, L.A., Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., et al. (2015) Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* **523**: 208-211.
- Bryant, J.A., Lamanna, C., Morlon, H., Kerkhoff, A.J., Enquist, B.J., y Green, J.L. (2008) Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11505-11511.
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., y Thomas, T. (2011) Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 14288-14293.
- Cai, L., Ye, L., Tong, A.H.Y., Lok, S., y Zhang, T. (2013) Biased Diversity Metrics Revealed by Bacterial 16S Pyrotags Derived from Different Primer Sets. *PLoS One* **8**:
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl** : 4516-4522.

- Caporaso, J.G., Paszkiewicz, K., Field, D., Knight, R., y Gilbert, J.A. (2012) The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME J.* **6**: 1089-1093.
- Chaffron, S., Rehrauer, H., Pernthaler, J., y Von Mering, C. (2010) A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Res.* **20**: 947-959.
- Chapin, F.S., Walker, B.H., Hobbs, R.J., Hooper, D.U., Lawton, J.H., Sala, O.E., y Tilman, D. (1997) Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science (80- )*. **277**: 500-504.
- Chapman, T.D., Matsch, L.C., y Zander, E.H. (1976) Effect of high dissolved oxygen concentration in activated sludge systems. *J. (Water Pollut. Control Fed.* **24**: 2486-2510.
- Chase, J.M. y Myers, J.A. (2011) Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**: 2351-2363.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., y Sghir, A. (2003) Molecular Evidence for Novel Planctomycete Diversity in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7354-7363.
- Chua, A.S.M., Takabatake, H., Satoh, H., y Mino, T. (2003) Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Res.* **37**: 3602-3611.
- Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J. a, Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., et al. (2012) Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* **149**: 1578-93.
- Çiggin, A.S., Orhon, D., Rossetti, S., y Majone, M. (2011) Short-term and long-term effects on carbon storage of pulse feeding on acclimated or unacclimated activated sludge. *Water Res.* **45**: 3119-3128.
- Cook, K.L., Garland, J.L., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Levine, L.H., y Sayler, G.S. (2006) Effect of microbial species richness on community stability and community function in a model plant-based wastewater processing system. *Microb. Ecol.* **52**: 725-737.
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A.C., Shimkets, L.J., Bennetzen, J.L., Habel, K.E., y Promislow, D.E.L. (2007) Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3470-3479.
- Costello, E.K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B.J.M., y Relman, D. a (2012) The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science (80- )*. **336**: 1255-62.
- Curtis, T.P., Head, I.M., y Graham, D.W. (2003) Peer reviewed: theoretical ecology for engineering biology. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 64A-70A.
- Curtis, T.P. y Sloan, W.T. (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 221-226.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., y Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10494-10499.
- Daims, H., Taylor, M.W., y Wagner, M. (2006) Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol.* **24**: 483-489.
- Dealtry, S., Holmsgaard, P.N., Dunon, V., Jechalke, S., Ding, G.-C., Krögerrecklenfort, E., et al. (2014) Shifts in Abundance and Diversity of Mobile Genetic Elements after the

- Introduction of Diverse Pesticides into an On-Farm Biopurification System over the Course of a Year. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4012-4020.
- DeAngelis, K.M., Gladden, J.M., Allgaier, M., D'haeseleer, P., Fortney, J.L., Reddy, A., et al. (2010) Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic-based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. *Bioenergy Res.* **3**: 146-158.
- Degenaar, a P., Ismail, a, y Bux, F. (2008) Comparative evaluation of the microbial community in biological processes treating industrial and domestic wastewaters. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 353-63.
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E., Beyersdorf, A.J., et al. (2013) Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 2575-80.
- De Deyn, G.B. y Van Der Putten, W.H. (2005) Linking aboveground and belowground diversity. *Trends Ecol. Evol.* **20**: 625-633.
- Dick, G.J., Andersson, A.F., Baker, B.J., Simmons, S.L., Thomas, B.C., Yelton, A.P., y Banfield, J.F. (2009) Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. *Genome Biol.* **10**: R85.
- Dignac, M.F., Ginestet, P., Rybacki, D., Bruchet, A., Urbain, V., y Scribe, P. (2000) Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: Nature of residual organic matter. *Water Res.* **34**: 4185-4194.
- Dinsdale, E. a, Edwards, R. a, Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J.M., et al. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**: 629-632.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., y Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194-2200.
- Eikelboom, D.H. y Van Buijssen, H.J.J. (1983) Microscopic sludge investigation manual.
- Ellis, T.G. (2004) Chemistry of wastewater. *Encycl. Life Support Syst.*
- Embree, M., Liu, J.K., Al-Bassam, M.M., y Zengler, K. (2015) Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201506034.
- Eren, a M., Maignien, L., Sul, W.J., Murphy, L.G., Grim, S.L., Morrison, H.G., y Sogin, M.L. (2013) Oligotyping: Differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods Ecol. Evol.* **4**: 1111-1119.
- Eschenhagen, M., Schuppler, M., y Roske, I. (2003) Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Res.* **37**: 3224-3232.
- Ettema, T.J.G. y Andersson, S.G.E. (2009) The alpha-proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. *Biol. Lett.* **5**: 429-432.
- Fang, H., Cai, L., Yu, Y., y Zhang, T. (2013) Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresour. Technol.* **129**: 209-218.
- FAO-UN / Aquastat (2010) [www.fao.org/nr/water/aquastat/wastewater/index.stm](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/wastewater/index.stm).
- Fernández, A.B., Ghai, R., Martin-Cuadrado, A.B., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., y Ventosa, A. (2014) Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* **88**: 623-

635.

- Fernandez, A.S., Hashsham, S.A., Dollhopf, S.L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F.B., et al. (2000) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4058-4067.
- Fierer, N. y Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 626-631.
- Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., et al. (2012) Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 21390-5.
- Fierer, N., McCain, C.M., Meir, P., Zimmermann, M., Rapp, J.M., Silman, M.R., y Knight, R. (2011) Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* **92**: 797-804.
- Figuerola, E.L.M. y Erijman, L. (2007) Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. *Environ. Microbiol.* **9**: 1780-1789.
- Flombaum, P., Gallegos, J.L., Gordillo, R. a, Rincón, J., Zabala, L.L., Jiao, N., et al. (2013) Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 9824-9.
- Foerster, K.U., von Mering, C., Hooper, S.D., y Bork, P. (2005) Environments shape the nucleotide composition of genomes. *EMBO Rep.* **6**: 1208-13.
- Franzosa, E. a., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X.C., y Huttenhower, C. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular «omics» for microbial community profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 360-72.
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E.S., Henry, C.S., Kupiec, M., et al. (2011) Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat. Commun.* **2**: 589.
- Gao, P., Xu, W., Sontag, P., Li, X., Xue, G., Liu, T., y Sun, W. (2016) Correlating microbial community compositions with environmental factors in activated sludge from four full-scale municipal wastewater treatment plants in Shanghai, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1-11.
- Van Der Gast, C.J., Ager, D., y Lilley, A.K. (2008) Temporal scaling of bacterial taxa is influenced by both stochastic and deterministic ecological factors. *Environ. Microbiol.* **10**: 1411-1418.
- Gaval, G. y Pernelle, J.-J. (2003) Impact of the repetition of oxygen deficiencies on the filamentous bacteria proliferation in activated sludge. *Water Res.* **37**: 1991-2000.
- Gillings, M.R. (2014) Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**: 257-277.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., y Zhu, Y.-G. (2015) Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* **9**: 1269-79.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., y Glover, L.A. (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* **7**: 301-313.

- Gómez, P. y Buckling, A. (2013) Real-time microbial adaptive diversification in soil. *Ecol. Lett.* **16**: 650-655.
- Gonsior, M., Zwartjes, M., Cooper, W.J., Song, W., Ishida, K.P., Tseng, L.Y., et al. (2011) Molecular characterization of effluent organic matter identified by ultrahigh resolution mass spectrometry. *Water Res.* **45**: 2943-2953.
- Grady Jr, C.P.L., Daigger, G.T., Love, N.G., y Filipe, C.D.M. (2011) Biological wastewater treatment CRC press.
- Graham, D.W. y Smith, V.H. (2004) Designed ecosystem services: application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front. Ecol. Environ.* **2**: 199-206.
- Green, J.L., Bohannan, B.J.M., y Whitaker, R.J. (2008) Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science (80-. )*. **320**: 1039-1043.
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., et al. (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* **21**: 494-504.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., et al. (2015) Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* **17**: 603-616.
- Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sörensson, F., Jarvis, A., y Lindgren, P.E. (2005) Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 629-640.
- Hansen, S.K., Rainey, P.B., Haagen, J.A.J., y Molin, S. (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533-536.
- Hashimoto, K., Matsuda, M., Inoue, D., y Ike, M. (2014) Bacterial community dynamics in a full-scale municipal wastewater treatment plant employing conventional activated sludge process. *J. Biosci. Bioeng.* **118**: 64-71.
- Hauduc, H., Rieger, L., Oehmen, A., van Loosdrecht, M.C.M., Comeau, Y., H??duit, A., et al. (2013) Critical review of activated sludge modeling: State of process knowledge, modeling concepts, and limitations. *Biotechnol. Bioeng.* **110**: 24-46.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E. a, DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., et al. (2010) Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science* **330**: 204-208.
- Hearn, E.M., Patel, D.R., y van den Berg, B. (2008) Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 8601-6.
- Henze, M. (2008) Biological wastewater treatment: principles, modelling and design IWA publishing.
- Henze, M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. En, *Water Science and Technology.*, pp. 1-15.
- Henze, M., Harremoes, P., la Cour Jansen, J., y Arvin, E. (2001) Wastewater treatment: biological and chemical processes Springer Science & Business Media.
- Heuer, H., Abdo, Z., y Smalla, K. (2008) Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 361-371.
- Heuer, H., Binh, C.T.T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Kr??gerrecklenfort, E., et al. (2012) IncP-1epsilon plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in



- agricultural systems: Diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Front. Microbiol.* **3**:
- Heuer, H. y Smalla, K. (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* **9**: 657-666.
- Heuer, H. y Smalla, K. (2012) Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 1083-1104.
- Holmes, A.J., Gillings, M.R., Nield, B.S., Mabbutt, B.C., Nevalainen, K.M.H., y Stokes, H.W. (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ. Microbiol.* **5**: 383-394.
- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., y Epstein, S.S. (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J.* **3**: 1365-1373.
- Horn, M. y Wagner, M. (2001) Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**: 71-74.
- Horner-Devine, M.C. y Bohannon, B.J.M. (2006) Phylogenetic clustering and overdispersion in bacterial communities. *Ecology* **87**:
- Horner-Devine, M.C., Lage, M., Hughes, J.B., y Bohannon, B.J.M. (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**: 750-753.
- Hoshino, T., Terahara, T., Yamada, K., Okuda, H., Suzuki, I., Tsuneda, S., et al. (2006) Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 459-470.
- Howe, A.C., Jansson, J.K., Malfatti, S. a, Tringe, S.G., Tiedje, J.M., y Brown, C.T. (2014) Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 4904-9.
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., y Xia, Y. (2012) Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour. Technol.* **117**: 72-79.
- Huang, Z., Gedalanga, P.B., Asvapathanagul, P., y Olson, B.H. (2010) Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Res.* **44**: 4351-4358.
- Hunter, P.R., Waite, M., y Ronchi, E. (2002) Drinking water and infectious disease: establishing the links CRC Press.
- INDEC (2010) [www.censo2010.indec.gov.ar/cuadrosDefinitivos/analisis\\_censo\\_feb12.pdf](http://www.censo2010.indec.gov.ar/cuadrosDefinitivos/analisis_censo_feb12.pdf).
- Insel, G., Guder, B., Gunes, G., y Cokgor, E.U. (2012) Are standard wastewater treatment plant design methods suitable for any municipal wastewater? *Water Sci. Technol.* **66**: 328-335.
- Jangid, K., Williams, M. a., Franzluebbbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., et al. (2008) Relative impacts of land use management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 2843-2853.
- Jechalke, S., Dealtry, S., Smalla, K., y Heuer, H. (2013) Quantification of IncP-1 plasmid prevalence in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 1410-1413.
- Jechalke, S., Schreiter, S., Wolters, B., Dealtry, S., Heuer, H., y Smalla, K. (2013) Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Front. Microbiol.* **4**: 420.
- Johnke, J., Cohen, Y., de Leeuw, M., Kushmaro, A., Jurkevitch, E., y Chatzinotas, A. (2014)

- Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **27**: 185-190.
- Johnson, D.R., Lee, T.K., Park, J., Fenner, K., y Helbling, D.E. (2014) The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability. *Environ. Microbiol.*
- Ju, F., Guo, F., Ye, L., Xia, Y., y Zhang, T. (2014) Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**: 80-89.
- Ju, F., Xia, Y., Guo, F., Wang, Z., y Zhang, T. (2014) Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.* **16**: 2421-2432.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., y Wagner, M. (2002) The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 84-99.
- Kaewpipat, K. y Grady, C.P.L. (2002) Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. En, *Water Science and Technology.*, pp. 19-27.
- Kim, B.-C., Kim, S., Shin, T., Kim, H., y Sang, B.-I. (2013) Comparison of the bacterial communities in anaerobic, anoxic, and oxic chambers of a pilot A2O process using pyrosequencing analysis. *Curr. Microbiol.* **66**: 555-565.
- Kim, T.-S., Jeong, J.-Y., Wells, G.F., y Park, H.-D. (2013) General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 1755-65.
- Kim, Y.M., Cho, H.U., Lee, D.S., Park, D., y Park, J.M. (2011) Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Res.* **45**: 5785-5795.
- Kindaichi, T., Nierychlo, M., Kragelund, C., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2013) High and stable substrate specificities of microorganisms in enhanced biological phosphorus removal plants. *Environ. Microbiol.* **15**: 1821-1831.
- King, A.J., Freeman, K.R., McCormick, K.F., Lynch, R.C., Lozupone, C., Knight, R., y Schmidt, S.K. (2010) Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nat. Commun.* **1**: 53.
- Koenig, J.E., Sharp, C., Dlutek, M., Curtis, B., Joss, M., Boucher, Y., y Doolittle, W.F. (2009) Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PLoS One* **4**: e5276.
- Koonin, E. V y Wolf, Y.I. (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* **36**: 6688-6719.
- Krulwich, T.A., Hicks, D.B., y Ito, M. (2009) Cation/proton antiporter complements of bacteria: Why so large and diverse?: MicroCommentary. *Mol. Microbiol.* **74**: 257-260.
- Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E., y Camerlengo, T. (2011) Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS One* **6**:
- Lamendella, R., Domingo, J.W.S., Ghosh, S., Martinson, J., y Oerther, D.B. (2011) Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol.* **11**: 103.

- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., y Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5111-5120.
- Levine, J.M. y Antonio, C.M.D. (1999) Elton revisited : a review linking diversity invasibility. *Oikos* **87**: 15-26.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., et al. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**: 1647-1651.
- de los Reyes III, F.L., Weaver, J.E., y Wang, L. (2015) A methodological framework for linking bioreactor function to microbial communities and environmental conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **33**: 112-118.
- Lozada, M., Figuerola, E.L.M., Itria, R.F., y Erijman, L. (2006) Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. *Environ. Microbiol.* **8**: 625-38.
- Lozupone, C. y Knight, R. (2005) UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8228-8235.
- Lozupone, C.A. y Knight, R. (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 11436-11440.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., y Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220-30.
- Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., y Olanczuk-Neyman, K. (2010) Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* **44**: 5089-5097.
- Lue-Hing, C. (1998) Municipal sewage sludge management: A reference text on processing, utilization and disposal CRC Press.
- Ma, L., Zhang, X.-X., Zhao, F., Wu, B., Cheng, S., y Yang, L. (2013) Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes. *J. Environ. Biol.* **34**: 391.
- Macalady, J.L., Vestling, M.M., Baumler, D., Boekelheide, N., Kaspar, C.W., y Banfield, J.F. (2004) Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: A key to survival in acid. *Extremophiles* **8**: 411-419.
- Mackelprang, R., Waldrop, M.P., DeAngelis, K.M., David, M.M., Chavarria, K.L., Blazewicz, S.J., et al. (2011) Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature* **480**: 368-371.
- Madoni, P. (1996) The sludge biotic index for the evaluation of the activated-sludge plant performance: The allocation of the ciliate *Acineria uncinata* to its correct functional group. *Acta Protozool.* **35**: 209-214.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., y Gerba, C.P. (2009) Environmental microbiology Academic press.
- Mande, S.S., Mohammed, M.H., y Ghosh, T.S. (2012) Classification of metagenomic sequences: Methods and challenges. *Brief. Bioinform.* **13**: 669-681.
- Mao, Y., Xia, Y., Wang, Z., y Zhang, T. (2014) Reconstructing a *Thauera* genome from a hydrogenotrophic-denitrifying consortium using metagenomic sequence data. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 6885-6895.
- Martins, A.M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J., y van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Filamentous bulking sludge--a critical review. *Water Res.* **38**: 793-817.

- Mason, O.U., Scott, N.M., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Bælum, J., Kimbrel, J., et al. (2014) Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J.* **8**: 1464-75.
- May, R.M. (1973) Stability and complexity in model ecosystems Princeton University Press.
- McCann, K.S. (2000) The diversity-stability debate. *Nature* **405**: 228-33.
- McGill, B.J., Etienne, R.S., Gray, J.S., Alonso, D., Anderson, M.J., Benecha, H.K., et al. (2007) Species abundance distributions: Moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecol. Lett.* **10**: 995-1015.
- McHardy, A.C., García Martín, H., Tsigirgos, A., Hugenholtz, P., y Rigoutsos, I. (2007) Accurate phylogenetic classification of variable-length DNA fragments. *Nat. Methods* **4**: 63-72.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., y O'Flaherty, V. (2003) Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 297-304.
- McIlroy, S.J., Saunders, A.M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A.A., et al. (2015) MiDAS: The field guide to the microbes of activated sludge. *Database* **2015**.
- McLellan, S.L., Huse, S.M., Mueller-Spitz, S.R., Andreishcheva, E.N., y Sogin, M.L. (2010) Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ. Microbiol.* **12**: 378-392.
- von Mering, C., Hugenholtz, P., Raes, J., Tringe, S.G., Doerks, T., Jensen, L.J., et al. (2007) Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* **315**: 1126-30.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., y Etal. (2008) The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**: 386.
- Michael, C. a, Gillings, M.R., Holmes, A.J., Hughes, L., Andrew, N.R., Holley, M.P., y Stokes, H.W. (2004) Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *Am. Nat.* **164**: 1-12.
- Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., y Okabe, S. (2007) Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Res.* **41**: 627-637.
- Mokracka, J., Koczura, R., y Kaznowski, A. (2012) Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* **46**: 3353-3363.
- More, R.P., Mitra, S., Raju, S.C., Kapley, A., y Purohit, H.J. (2014) Mining and assessment of catabolic pathways in the metagenome of a common effluent treatment plant to induce the degradative capacity of biomass. *Bioresour. Technol.* **153**: 137-146.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., y Correia, A. (2010) Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* **161**: 58-66.
- Muegge, B.D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J.C., González, A., Fontana, L., et al. (2011) Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* **332**: 970-974.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., y Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.

- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H.E., Moran, N.A., y Hattori, M. (2006) The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* (80-). **314**: 267.
- Namiki, T., Hachiya, T., Tanaka, H., y Sakakibara, Y. (2012) MetaVelvet: An extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Res.* **40**:
- Nemergut, D.R., Schmidt, S.K., Fukami, T., O'Neill, S.P., Bilinski, T.M., Stanish, L.F., et al. (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**: 342-56.
- Ng, W.J. y Tjan, K.W. (2006) Industrial wastewater treatment World Scientific.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., y Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* **10**: 2966-2978.
- Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., et al. (2014) Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**: 822-828.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., y Nielsen, J.L. (2009) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 969-998.
- Nielsen, P.H. y McMahon, K.D. (2014) Microbiology and microbial ecology of the activated sludge process. *Act. Sludge--100 Years Counting, IWA Publ. London* 53-75.
- Nielsen, P.H., Saunders, A.M., Hansen, A.A., Larsen, P., y Nielsen, J.L. (2012) Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater — a model system in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 452-459.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvaunya, R., Read, J., y Steiner, W. (2002) Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res.* **36**: 1449-1456.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., y Groisman, E. a (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Ofiteru, I.D., Lunn, M., Curtis, T.P., Wells, G.F., Criddle, C.S., Francis, C. a, y Sloan, W.T. (2010) Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 15345-50.
- Orhon, D., Babuna, F.G., y Karahan, O. (2009) Industrial wastewater treatment by activated sludge. *Water Intell. Online* **8**: 9781780401836.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J. V., Chuang, H.Y., Cohoon, M., et al. (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* **33**: 5691-5702.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., y Krulwich, T.A. (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1717**: 67-88.
- Papke, R.T. y Ward, D.M. (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 293-303.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., y Beiko, R.G. (2014) STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**: btu494-.
- Parsley, L.C., Consuegra, E.J., Kakirde, K.S., Land, A.M., Harper, W.F., y Liles, M.R. (2010) Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial,

- plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 3753-3757.
- Paul, E., Plisson-Saune, S., Mauret, M., y Cantet, J. (1998) Process state evaluation of alternating oxic-anoxic activated sludge using ORP, pH and DO. *Water Sci. Technol.* **38**: 299-306.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., et al. (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 6548-53.
- Philippot, L., Andersson, S.G.E., Battin, T.J., Prosser, J.I., Schimel, J.P., Whitman, W.B., y Hallin, S. (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 523-529.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N.P.A., Čuhel, J., Arrouays, D., Šimek, M., y Hallin, S. (2009) Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environ. Microbiol.* **11**: 3096-3104.
- Pholchan, M.K., Baptista, J. de C., Davenport, R.J., y Curtis, T.P. (2010) Systematic study of the effect of operating variables on reactor performance and microbial diversity in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Res.* **44**: 1341-1352.
- Pike, E.B. y Curds, C.R. (1971) The microbial ecology of the activated sludge process. *Microb. Asp. Pollut.* 123-147.
- Pinto, A.J. y Raskin, L. (2012) PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLoS One* **7**.
- Polz, M.F., Alm, E.J., y Hanage, W.P. (2013) Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends Genet.* **29**: 170-5.
- Prosser, J.I., Bohannan, B.J.M.B.J.M., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., Freckleton, R.P., et al. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 384-392.
- Pujol, R., Duchene, P., Schetrite, S., y Canler, J.P. (1991) Biological foams in activated sludge plants: characterization and situation. *Water Res.* **25**: 1399-1404.
- Quince, C., Curtis, T.P., y Sloan, W.T. (2008) The rational exploration of microbial diversity. *ISME J.* **2**: 997-1006.
- Ramette, A. y Tiedje, J.M. (2007) Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb. Ecol.* **53**: 197-207.
- Redford, A.J., Bowers, R.M., Knight, R., Linhart, Y., y Fierer, N. (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ. Microbiol.* **12**: 2885-2893.
- Reichenberger, E.R., Rosen, G., Hershberg, U., y Hershberg, R. (2015) Prokaryotic nucleotide composition is shaped by both phylogeny and the environment. *Genome Biol. Evol.* **7**: 1380-1389.
- Rittmann, B.E., Lov, G., Ok, S., Oerther, B., Hausner, M., Löffler, F., et al. (2006) A Vista for Microbial Ecology and Environmental Biotechnology. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 1096-1103.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., et al. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* **3**: 700-714.

- Robinson, C.J., Bohannon, B.J.M., y Young, V.B. (2010) From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 453-76.
- Rocha, E.P.C. y Danchin, A. (2002) Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet.* **18**: 291-294.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1**: 283-90.
- Ross, M.G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N.J., Hegarty, R., et al. (2013) Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol.* **14**: R51.
- Rossetti, S., Carucci, A., y Rolle, E. (1994) Survey on the occurrence of filamentous organisms in municipal wastewater treatment plants related to their operating conditions. En, *Water Science and Technology.*, pp. 305-308.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* **4**: 1340-1351.
- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., y Head, I.M. (2003) Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 195-206.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., y Mazel, D. (2002) Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1657-1669.
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., y Oerther, D.B. (2005) Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5814-5822.
- Sanapareddy, N., Hamp, T.J., Gonzalez, L.C., Hilger, H.A., Fodor, A.A., y Clinton, S.M. (2009) Molecular diversity of a north carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1688-1696.
- Sandvang, D., Aarestrup, F.M., y Jensen, L.B. (1997) Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 177-181.
- Saunders, A.M., Albertsen, M., Vollesen, J., Nielsen, P.H., Vollertsen, J., y Nielsen, P.H. (2016) The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME J.* **10**: 11-20.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537-7541.
- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T.L., Morgan, X.C., Garrett, W.S., y Huttenhower, C. (2013) Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol. Syst. Biol.* **9**: 666.
- Seviour, R., Halkjær, P., y Nielsen, R. (2010) Microbial ecology of activated sludge. *Water Intell. Online* **9**: 9781780401645.
- Sheik, A.R., Muller, E.E.L., y Wilmes, P. (2014) A hundred years of activated sludge: Time for a rethink. *Front. Microbiol.* **5**:
- Sin, G., Van Hulle, S.W.H., De Pauw, D.J.W., Van Griensven, A., y Vanrolleghem, P.A. (2005) A

- critical comparison of systematic calibration protocols for activated sludge models: A SWOT analysis. *Water Res.* **39**: 2459-2474.
- Sipos, R., Székely, A.J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., y Nikolausz, M. (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 341-350.
- Smalla, K., Haines, A.S., Jones, K., Krögerrecklenfort, E., Heuer, H., Schloter, M., y Thomas, C.M. (2006) Increased abundance of IncP-1 $\beta$  plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: First discovery of IncP-1 $\beta$  plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7253-7259.
- Smalla, K. y Sobecky, P.A. (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 165-175.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2884-2896.
- Sorokin, D.Y. (2005) Is there a limit for high-pH life? *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1405-1406.
- Spehn, E.M., Joshi, J., Schmid, B., Alpei, J., y Körner, C. (2000) Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. *Plant Soil* **224**: 217-230.
- Stokes, H.W., Holmes, A.J., Nield, B.S., Holley, M.P., Nevalainen, K.M.H., Mabbutt, B.C., y Gillings, M.R. (2001) Gene Cassette PCR: Sequence-Independent Recovery of Entire Genes from Environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5240-5246.
- Stricker, A.E. y Racault, Y. (2005) Application of activated sludge model No. 1 to biological treatment of pure winery effluents: Case studies. *Water Sci. Technol.* **51**: 121-127.
- Sueoka, N. (1962) On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**: 582-592.
- Sunagawa, S., Coelho, L.P., Chaffron, S., Kultima, J.R., Labadie, K., Salazar, G., et al. (2015) Structure and function of the global ocean microbiome. *Science (80-. )*. **348**: 1-10.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., y DeLong, E.F. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4605-4614.
- Szabo, K.E., Itor, P.O.B., Bertilsson, S., Tranvik, L., y Eiler, A. (2007) Importance of rare and abundant populations for the structure and functional potential of freshwater bacterial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **47**: 1-10.
- The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**: 207-14.
- Thomas, C.M. y Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**: 711-721.
- Thomas, T., Gilbert, J., y Meyer, F. (2012) Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* **2**: 3.
- Tilman, D. (1982) Resource competition and community structure Princeton University Press.
- Tolker-Nielsen, T. y Molin, S. (2000) Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* **40**: 75-84.



- Tomita, R.K., Park, S.W., y Sotomayor, O.A.Z. (2002) Analysis of activated sludge process using multivariate statistical tools—a PCA approach. *Chem. Eng. J.* **90**: 283-290.
- Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Drewes, J.E., y Snyder, S.A. (2008) Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1190**: 253-262.
- Tringe, S.G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. a, Chen, K., Chang, H.W., et al. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* **308**: 554-7.
- Truong, D.T., Franzosa, E.A., Tickle, T.L., Scholz, M., Weingart, G., Pasolli, E., et al. (2015) MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat. Methods* **12**: 902-903.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., y Gordon, J.I. (2008) Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* **3**: 213-223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480-484.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37-43.
- Ubay Cokgör, E., Sözen, S., Insel, G., y Orhon, D. (2009) Respirometric evaluation of biodegradation characteristics of dairy wastewater for organic carbon removal. *Environ. Technol.* **30**: 1169-76.
- UN (2000) [www.un.org/millenniumgoals/](http://www.un.org/millenniumgoals/).
- Valentín-Vargas, A., Toro-Labrador, G., y Massol-Deya, A.A. (2012) Bacterial community dynamics in full-scale activated sludge bioreactors: operational and ecological factors driving community assembly and performance. *PLoS One* **7**: e42524.
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P.S., y Trevisan, M. (2012) Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLoS One* **7**:
- Vedler, E., Vahter, M., y Heinaru, A. (2004) The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring tfd genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *J. Bacteriol.* **186**: 7161-7174.
- Vellend, M. (2010) Conceptual synthesis in community ecology. *Q. Rev. Biol.* **85**: 183-206.
- Verberkmoes, N.C., Russell, A.L., Shah, M., Godzik, A., Rosenquist, M., Halfvarson, J., et al. (2009) Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J.* **3**: 179-89.
- Vuono, D.C., Benecke, J., Henkel, J., Navidi, W.C., Cath, T.Y., Munakata-Marr, J., et al. (2015) Disturbance and temporal partitioning of the activated sludge metacommunity. *ISME J.* **9**: 425-435.
- Wagner, M. y Horn, M. (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 241-249.
- Wagner, M. y Loy, A. (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 218-227.
- Wagner, M., Nielsen, P.H., Loy, A., Nielsen, J.L., y Daims, H. (2006) Linking microbial community structure with function: Fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 83-91.

- Walker, B., Holling, C.S., Carpenter, S.R., y Kinzig, A. (2004) Resilience, Adaptability and Transformability in Social – ecological Systems. *Ecol. Soc.* **9**: 5.
- Wang, G.C.Y. y Wang, Y. (1997) Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4645-4650.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., y Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5261-5267.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., y Ding, K. (2012) Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in china. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7042-7047.
- Wang, X., Wen, X., Yan, H., Ding, K., Zhao, F., y Hu, M. (2011) Bacterial community dynamics in a functionally stable pilot-scale wastewater treatment plant. *Bioresour. Technol.* **102**: 2352-7.
- Wang, X., Xia, Y., Wen, X., Yang, Y., y Zhou, J. (2014) Microbial community functional structures in wastewater treatment plants as characterized by GeoChip. *PLoS One* **9**:
- Wei, C., He, W., Wei, L., Li, C., y Ma, J. (2015) The Analysis of a Microbial Community in the UV/O<sub>3</sub>-Anaerobic/Aerobic Integrated Process for Petrochemical Nanofiltration Concentrate (NFC) Treatment by 454-Pyrosequencing. *PLoS One* **10**: e0139991.
- Weinbauer, M.G. y Rassoulzadegan, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* **6**: 1-11.
- Wells, G.F., Park, H.D., Eggleston, B., Francis, C.A., y Criddle, C.S. (2011) Fine-scale bacterial community dynamics and the taxa-time relationship within a full-scale activated sludge bioreactor. *Water Res.* **45**: 5476-5488.
- Wen, Q., Tutuka, C., Keegan, A., y Jin, B. (2009) Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. *J. Environ. Manage.* **90**: 1442-1447.
- Wennekes, P.L., Rosindell, J., y Etienne, R.S. (2012) The Neutral-Niche Debate: A Philosophical Perspective. *Acta Biotheor.* **60**: 257-271.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., et al. (2011) Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 4158-63.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., y Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.
- Wiesmann, U. (1994) Biological nitrogen removal from wastewater. *Biotechnics/wastewater* 113-154.
- Wilke, A., Harrison, T., Wilkening, J., Field, D., Glass, E.M., Kyrpides, N., et al. (2012) The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics* **13**: 141.
- von Wintzingerode, F. V., Göbel, U.B., y Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
- Wommack, K.E., Bhavsar, J., y Ravel, J. (2008) Metagenomics: Read length matters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1453-1463.

- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., y McArthur, J.V. (2008) Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* **2**: 417-428.
- Wu, H., Zhang, Z., Hu, S., y Yu, J. (2012) On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes. *Biol. Direct* **7**: 2.
- Xia, S., Duan, L., Song, Y., Li, J., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., et al. (2010) Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 7391-7396.
- Xia, Y., Kong, Y., y Nielsen, P.H. (2007) In situ detection of protein-hydrolysing microorganisms in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 156-165.
- Xia, Y., Wang, X., Wen, X., Ding, K., Zhou, J., Yang, Y., y Zhang, Y. (2014) Overall functional gene diversity of microbial communities in three full-scale activated sludge bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 7233-7242.
- Xiuheng, W., Zhang, K., Nanqi, R.E.N., Nan, L.I., y Lijiao, R.E.N. (2009) Monitoring microbial community structure and succession of an A/O SBR during start-up period using PCR-DGGE. *J. Environ. Sci.* **21**: 223-228.
- Xu, Z., Malmer, D., Langille, M.G.I., Way, S.F., y Knight, R. (2014) Which is more important for classifying microbial communities: who's there or what they can do? *ISME J.* **8**: 2357-2359.
- Yadav, T.C., Pal, R.R., Shastri, S., Jadeja, N.B., y Kapley, A. (2015) Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. *Bioresour. Technol.*
- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., et al. (2012) Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresour. Technol.* **111**: 49-54.
- Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Li, Q., Li, B., Wang, S., et al. (2011) Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 7408-15.
- Yang, Y., Li, B., Ju, F., y Zhang, T. (2013) Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. *Environ. Sci. Technol.* **47**: 10197-10205.
- Yang, Y., Li, B., Zou, S., Fang, H.H.P., y Zhang, T. (2014) Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res.* **62C**: 97-106.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**: 222-227.
- Ye, L. y Zhang, T. (2013) Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 2681-2690.
- Ye, L., Zhang, T., Wang, T., y Fang, Z. (2012) Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 13244-52.
- Yemm, E.W. y Willis, A.J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* **57**: 508.

- Yoon Kim, H., Yeon, K.-M., Lee, C.-H., Lee, S., y Swaminathan, T. (2006) Biofilm structure and extracellular polymeric substances in low and high dissolved oxygen membrane bioreactors. *Sep. Sci. Technol.* **41**: 1213-1230.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., y Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15681-6.
- Zerbino, D.R. y Birney, E. (2008) Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **18**: 821-829.
- Zhang, T., Liu, Y., y Fang, H.H.P. (2005) Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process. *Biotechnol. Bioeng.* **92**: 173-182.
- Zhang, T., Shao, M.-F., y Ye, L. (2012) 454 Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity of Activated Sludge From 14 Sewage Treatment Plants. *ISME J.* **6**: 1137-47.
- Zhang, W., Werner, J.J., Agler, M.T., y Angenent, L.T. (2014) Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.* **151**: 397-401.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.Y., Marsh, T.L., O'Neill, R. V., et al. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 326-334.